

TESIS DE DOCTORADO

**DINÁMICA POBLACIONAL DE
LAS GARRAPATAS EXÓFILAS
EN EL NOROESTE DE ESPAÑA
Y SU PAPEL COMO VECTORES
DE AGENTES INFECTO-
PARASITARIOS DE
IMPORTANCIA VETERINARIA
Y MÉDICA**

Susana Remesar Alonso

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA E SANIDADE VETERINARIA

LUGO 2019



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

**Dinámica poblacional de las garrapatas exófilas en el noroeste
de España y su papel como vectores de agentes infecto-
parasitarios de importancia veterinaria y médica**

D./Dña. Susana Remesar Alonso

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Dinámica poblacional de las garrapatas exófilas en el noroeste
de España y su papel como vectores de agentes infecto-
parasitarios de importancia veterinaria y médica**

D./Dña. Patrocinio Morrondo Pelayo
D./Dña. Gonzalo Fernández Rodríguez
D./Dña. Pablo Díaz Fernández

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. Susana Remesar Alonso bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En _____ de _____ de 20__



FINANCIACIÓN

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de los siguientes proyectos de investigación:

-Axuda de apoio á etapa predoutoral nas universidades do SUG, nos organismos públicos de investigación de Galicia e noutras entidades do Sistema galego de I+D+i, cofinanciadas parcialmente polo programa operativo FSE Galicia 2014-2020. (30/06/2016 - 29/06/2019).

-Axuda para estadias de 3 meses de duración no estranxeiro asociadas ás Axuda de apoio á etapa predoutoral para que, de acordo co establecido no Real decreto 99/2011, do 28 de xaneiro, as persoas contratadas acaden a mención de doutor/a internacional. (01/08/2017 - 31/10/2017).

-Axuda para a Consolidación e Estruturación de Unidades de Investigación Competitivas do Sistema Univeritario de Galicia. Grupos de Referencia Competitiva (GR2015/003). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. (2015 - 2018).

Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

-Consolidación e Estruturación. Redes GI-1702 RUMIGAL. Rede de estudo multidisciplinar dos ruminantes en Galicia (2017-2019). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria.

Investigador responsable: Pablo Díez Baños.



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA
Secretaría Xeral de Universidades



Union Europea

Fondo Social Europeo
"El FSE invierte en tu futuro"



PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A) Artículos de investigación:

1. Díaz, P., **Remesar, S.**, Venzal J. M., Vázquez-López, M. E., Fernández, G., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Panadero, R. (2019). Occurrence of *Borrelia* and *Borrelia* species in *Ixodes ricinus* collected from roe deer in northwestern Spain. **Medical and Veterinary Entomology**, **7**. DOI: 10.1111/mve.12364.
2. **Remesar, S.**, Fernández, P., Venzal, J., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Estrada-Peña, A., López, C., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2019). Tick species diversity and population dynamics of *Ixodes ricinus* in Galicia (north-western Spain). **Ticks and Tick-borne Diseases**, **10**: 132-137. Elsevier, ISSN 1877959X. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.09.006.
3. Díaz, P., Arnal, J. L., **Remesar, S.**, Pérez-Creo, A., Venzal, J. M., Vázquez-López, M. E., Prieto, A., Fernández, G., López, C. M., Panadero, R., Benito, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2017). Molecular identification of *Borrelia* spirochetes in questing *Ixodes ricinus* from northwestern Spain. **Parasites & Vectors**, **10** (615): 1-7. 2017. ISSN 1756-3305. DOI: 10.1186/s13071-017-2574-x.
4. Morrondo, P., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Cabanelas, E., Díaz-Cao, J. M., Arias, M., Díaz, P., Pajares, G., **Remesar, S.**, López-Sandez, C. M., Fernández, G., Díez-Baños, P., Panadero, R. (2016). Prevalence and distribution of infectious and parasitic agents in roe deer from Spain and their possible role as reservoirs. **Italian Journal of Animal Science**, **16**: 266-274. 2017. ISSN 1594-4077. DOI: 10.1080/1828051X.2016.1245593.

B) Artículos de divulgación:

1. Rayas, H., Fernández-Salguero, P., Prieto, A., **Remesar, S.**, San-José, C., Talavera, V., Camacho, L., Gómez-Guillamón, F. (2018). Estudio de prevalencia de agentes patógenos en corzo (*Capreolus capreolus*) transmitidos por garrapatas en el área cinegética de los Alcornocales. *Almoraima. Revista de Estudios Campogibraltareños*, 49: 25-32. (España). ISSN 1133-5319.

2. Díaz, P., **Remesar, S.**, Cerviño, S., Pérez-Creo, A., Cabanelas, E., Panadero, R., Pajares, G., Arias, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P. (2017). Infección por *Ixodes ricinus* en corzos del noroeste de España. *Boletín de la asociación del Corzo Español*, 15:155-162. (España). ISBN: 978-84-697-2819-2. Depósito legal: M-13314-2017.

C) Contribuciones a congresos:

1. **Remesar, S.**, Díaz, P., Portillo, A., Santibañez, S., Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., López, C.M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Oteo, J.A., Morrondo, P. (2019). Prevalencia y caracterización molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas recogidas de la vegetación en Galicia (Noroeste de España). **XXIII Congreso nacional de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, 23-25/05/2019. Madrid (España). Póster.

2. **Remesar, S.**, Díaz, P., J. Venzal, J.M., Prieto, A., Estrada-Peña, A., López-Sández, C., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2019). Longitudinal study of infection with *Borrelia* spp. in questing *Ixodes ricinus* from northwestern Spain. **13th International Symposium on Ticks and Tick-borne diseases**, 28-30/03/2019. Weimar (Germany). Póster.

3. Prieto, A., **Remesar, S.**, Díaz, P., Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., Markina, F., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2019). Prevalence and zoonotic potential of *Anaplasma phagocytophilum* in

roe deer from Spain. **13th International Symposium on Ticks and Tick-borne diseases**, 28-30/03/2019. Weimar (Germany). Póster.

4. Remesar, S., Díaz, P., Portillo, A., Santibañez, S., Díaz-Cao, J.M., López-Sández, C., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Oteo, J.A., Morrondo, P. (2019). Prevalence and molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks from Galicia (NW Spain) **13th International Symposium on Ticks and Tick-borne diseases**, 28-30/03/2019. Weimar (Germany). Póster.

5. Remesar, S., Díaz, P., Fernández, G., Morrondo, P. (2018). Infección por *Rickettsia* spp. en carrachas recollidas en Galicia. **Divulgaterra: petiscos de divulgación científica. Escuela de Normalización Lingüística, USC**, 15/11/2018. Lugo (España). Oral.

6. Díaz, P., **Remesar, S.,** Prieto, A., Fernández, G., López, C.M., Panadero, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2018). *Borrelia* genospecies detected in *Ixodes ricinus* collected in roe deer from North-Western Spain. **XXIII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants and Congresso Nazionale della Società Italiana di Buiatria**, 10-13/10/2018. Bologna (Italy). Póster.

7. Remesar, S., Díaz, P., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., Panadero, R., López, C.M., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2018). Population dynamics of questing ticks from Galicia (Northwest Spain). **Meeting of the Belgian Parasitology Society, Belgian Society of Parasitology and Protistology**, 03-04/05/2018. Brussels (Belgium). Póster.

8. Remesar, S. (2017). Dinámica poboacional das carrachas recollidas na vexetación en Galicia. **Divulgaterra: petiscos de divulgación científica. Escuela de Normalización Lingüística, USC**, 09/11/2017. Lugo (España). Oral.

9. Rayas, E., Fernández-Salguero, P., Prieto, A., **Remesar, S.**, Gómez-Guillamón, F., San José, C., Talavera, V., Camacho, L. (2017) Estudio de prevalencia de agentes patógenos en corzo transmitidos por garrapatas en el área cinegética de Alcornocales. **XII Jornadas de flora y fauna del campo de Gibraltar**, 20/10/2017. Tarifa (España). Oral.

10. **Remesar, S.**, Díaz, P., Fernandez, G., Morrondo, P. (2017) Identificación molecular de genoespecies de *Borrelia* de interés zoonótico halladas en garrapatas recolectadas en la vegetación en Galicia. **V Encontro da Mocidade Investigadora. Escola de Doutoramento Internacional**, 12-13/06/2017. Santiago de Compostela (España). Oral.

11. **Remesar, S.** (2016). Infección por *Borrelia* en carrachas recollidas en Galicia. **Divulgaterra: petiscos de divulgación científica. Escuela de Normalización Lingüística, USC**, 09/11/2016. Lugo (España). Oral.

12. **Remesar, S.**, Díaz, P., Morrondo, P. (2016). Parasitación por garrapatas en corzos de Galicia: Identificación molecular de diversas especies de *Borrelia* de interés zoonótico. **IV Encontro da Mocidade Investigadora. Escola de Doutoramento Internacional**, 10-11/06/2016. Santiago de Compostela (España). Oral.

AGRADECIMIENTOS

Siendo ésta la última parte que escribo de mi tesis, es para mí una tarea muy agradable mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en la realización de la misma y de manera especial:

A mis directores, Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo por su dedicación y apoyo; al Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez por sus constantes aportaciones compartiendo su amplio conocimiento en enfermedades infecciosas y al Dr. Pablo Díaz Fernández por su ayuda durante los muestreos y por la solución de dudas en general.

A los integrantes del Grupo INVESAGA: D. Pablo Díez Baños, Catedrático de la Sanidad Animal, por poner a mi disposición todos los medios necesarios del laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias, así como por aportarme todos sus conocimientos y experiencia siempre que lo he necesitado; a los Profesores Titulares D. Ceferino López Sáñez, por su ayuda en la resolución de los “problemas estadísticos” y a D^a Rosario Panadero Fontán por su disposición a echar siempre una mano. A mis compañeros de despacho y laboratorio, por los buenos ratos que hemos compartido durante estos años, especialmente a Ana Pérez Creo, Alberto Prieto Lago, José Manuel Díaz Cao, Eva Cabanelas Dopazo, David García Dios, Gonzalo López Lorenzo y Cynthia López Novo.

A los Profesores Titulares de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo, D^a Rita Sánchez-Andrade y D. Adolfo Paz Silva y a la Dra. María Sol Arias por su ayuda, siempre que la he necesitado.

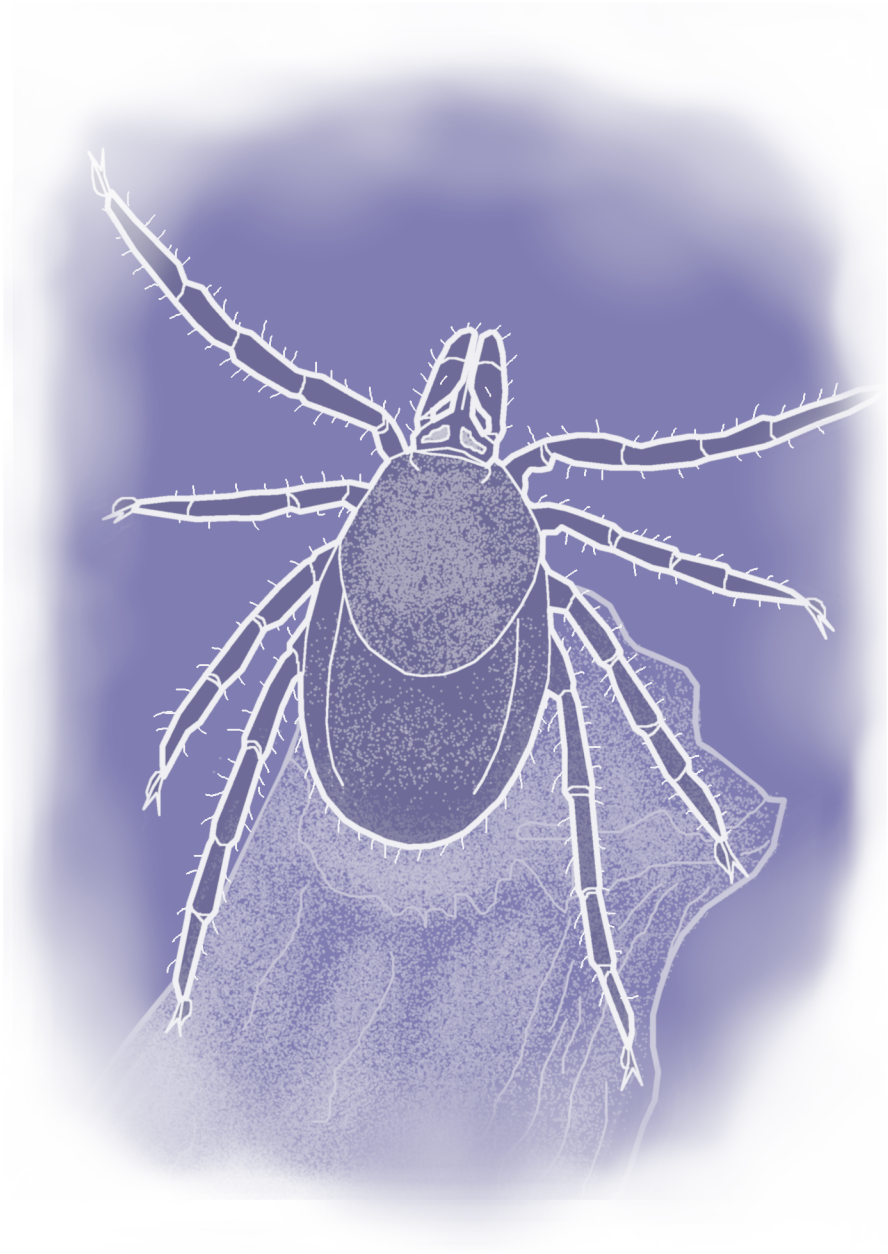
Así mismo quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Agustín Estrada Peña, Catedrático del departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza, por su ayuda en la identificación de las garrapatas y a los Doctores D. José Manuel Venzal Bianchi y D. José Antonio Oteo Revuelta del Laboratorio de vectores y enfermedades transmitidas de Uruguay y del Laboratorio de Patógenos Especiales de

Logroño; así como, al resto del personal de sus respectivos centros de investigación, por el excelente trato recibido durante los meses de estancia.

A todas las personas que se acordaban de mí al ver cualquier insecto/arácnido e intentaban describírmelo con gestos y expresiones faciales...

A mi familia por su constante apoyo y a mis compañeros de Vigo y Lugo que me permitían relajarme, al mantener con ellos conversaciones ajenas al “mundo de las garrapatas”.





*A todas esas garrapatas que dieron
involuntariamente su vida por la ciencia.*



ÍNDICE

1. ANTECEDENTES DEL TEMA.....	3
1.1. GARRAPATAS	3
1.1.1. Taxonomía.....	3
1.1.2. Anatomía	7
1.1.3. Fenología de las garrapatas y su influencia en la transmisión de enfermedades.....	12
1.1.4. Ciclo biológico.....	16
1.1.5. Localización y fijación al hospedador.....	20
1.1.6. Métodos de captura	23
1.1.7. Principales especies de garrapatas en Europa	25
1.1.8. Especies de garrapatas identificadas en España.....	37
1.2. LAS GARRAPATAS COMO VECTORES.....	42
1.2.1. Anaplasmosis.....	45
1.2.1.1. Epidemiología y epidemiología molecular.....	46
1.2.1.2. Vectores	47
1.2.1.3. Hospedadores	49
1.2.1.4. Ciclo de vida	51
1.2.1.5. Manifestaciones clínicas.....	53
1.2.2. Babesiosis y Theileriosis.....	53
1.2.2.1. Epidemiología	54
1.2.2.2. Vectores y hospedadores	55
1.2.2.3. Ciclo de vida	57
1.2.2.4. Manifestaciones clínicas.....	61
1.2.3. Borreliosis	62
1.2.3.1. Epidemiología	62
1.2.3.2. Vectores	66
1.2.3.3. Hospedadores	67
1.2.3.4. Ciclo de vida	70
1.2.3.5. Manifestaciones clínicas.....	72
1.2.4. Rickettsiosis	73
1.2.4.1. Epidemiología	74
1.2.4.2. Vectores	80
1.2.4.3. Hospedadores	82
1.2.4.4. Ciclo de vida	84
1.2.4.5. Manifestaciones clínicas.....	86

2. OBJETIVOS	91
3. MATERIALES Y MÉTODOS	95
3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	95
3.2. DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS GARRAPATAS	97
3.2.1. Muestreo.....	97
3.2.2. Identificación, etiquetado y preservación de las garrapatas	99
3.2.3. Variables para el estudio de la dinámica poblacional de las garrapatas y análisis estadístico.....	102
3.3. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE PATÓGENOS	104
3.3.1. Cálculo del número de garrapatas a analizar.....	104
3.3.2. Obtención de controles positivos y negativos	104
3.3.3. Identificación de los patógenos estudiados	105
3.3.4. Análisis estadísticos	108
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
4.1. GARRAPATAS IDENTIFICADAS Y DINÁMICA DE POBLACIONES.....	111
4.1.1. Especies de garrapatas identificadas	111
4.1.2. Dinámica de las poblaciones de <i>I. ricinus</i>	121
4.1.3. Influencia de los parámetros climáticos en las poblaciones de <i>I. ricinus</i>	124
4.2. DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN LAS GARRAPATAS.....	128
4.2.1. <i>Anaplasma</i> spp.	128
4.2.1.1. Prevalencia y especies	128
4.2.1.2. Dinámica de infección.....	130
4.2.1.3. Caracterización de cepas	132
4.2.2. <i>Babesia</i> spp. y <i>Theileria</i> spp.	139
4.2.2.1. Prevalencia total	139
4.2.2.2. Especies y prevalencia	141
4.2.2.3. Dinámica de infección.....	143
4.2.3. <i>Borrelia</i> spp.....	146
4.2.3.1. Prevalencia total	146
4.2.3.2. Especies/genoespecies y prevalencia	147
4.2.3.3. Dinámica de infección.....	152

4.2.4. <i>Rickettsia</i> spp.	159
4.2.4.1. Protocolos de PCR	159
4.2.4.2. Prevalencia total	163
4.2.4.3. Especies y prevalencia	164
4.2.4.4. Dinámica de infección.....	172
4.2.5. Coinfecciones.....	177
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS/CONCLUSIÓN	183
6. RESUMEN/SUMMARY/RESUMO	195
7. BIBLIOGRAFÍA	215







ANTECEDENTES



1. ANTECEDENTES

Debido a que en esta Tesis Doctoral se aborda el estudio de la distribución de las garrapatas y la dinámica de sus poblaciones, así como los agentes patógenos que pueden vehicular, esta división también se establece en los Antecedentes del tema.

1.1. GARRAPATAS

1.1.1. Taxonomía

El 80% de las especies animales identificadas pertenecen al Phylum Arthropoda (Tabla 1.1.) al cual pertenecen a su vez un número relativamente bajo de especies relacionadas directamente o indirectamente con la salud pública (Bowman, 2011).

Tabla 1.1. Posición sistemática y clasificación de las garrapatas (Pérez-Eid, 2007; Nava *et al.*, 2017) modificada por Remesar (2019)

Phylum:	Arthropoda (Siebold y Stanius, 1845).
Subphylum:	Chelicerata (Heymons, 1901).
Clase:	Arachnida (Lamark, 1801).
Subclase:	Acari (Van der Hammen, 1961).
Superorden:	Parasitiformes (Leach, 1815).
Orden:	Ixodida (Van der Hammen, 1968).
Superfamilia	Ixodoidea (Van der Hammen, 1968)

Las garrapatas son artrópodos pertenecientes al Orden Ixodida, el cual, a su vez, se encuentra dividido en tres Familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae, diferenciadas tanto por su anatomía como por sus ciclos biológicos.

Las garrapatas duras pertenecen a la Familia Ixodidae, que está integrada por aproximadamente 722 especies. Esta Familia se divide en dos grupos atendiendo a sus características morfológicas y biológicas. Todas las especies del género *Ixodes* pertenecen al grupo prostriata y se caracterizan externamente por la presencia de un surco

anal en posición anterior al ano y por la presencia de placas en la zona ventral posterior de los machos. El resto de las garrapatas son metastriata, con el surco anal situado detrás del ano y ausencia de placas en la parte posterior de los machos. Las garrapatas blandas pertenecen a la Familia Argasidae que está integrada por aproximadamente 208 especies, mientras que a la Familia Nuttalliellidae pertenece exclusivamente *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone *et al.*, 2010).

En la Figura 1.1. se ilustra la taxonomía de las tres Familias del Orden Ixodida.

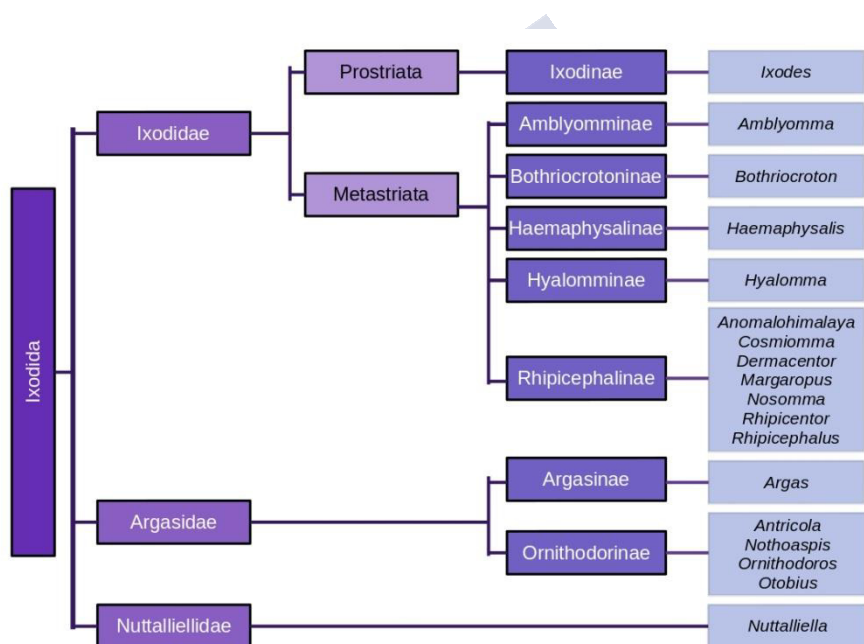


Figura 1.1. Sistemática de las Familias Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae

Los ejemplares de la Familia Ixodidae (Figura 1.2.) tienen un escudo que cubre toda la superficie dorsal de los machos y parte de la superficie dorsal de las hembras. Las aperturas respiratorias, también denominadas estigmas, se encuentran tras el último par de patas a ambos lados del cuerpo formando las denominadas placas estigmáticas (Bowman, 2011). Las garrapatas de la Familia Argasidae

carecen de escudo y el aparato bucal no es visible dorsalmente (Figura 1.2.); los estigmas respiratorios son simples y se localizan entre la coxa 3 y 4 (Bowman, 2011). El único representante de la Familia Nuttalliellidae (*Nuttalliella namaqua*) presenta un pseudoescudo esclerotizado y un capitulo en posición apical (Figura 1.2.) características por las cuales fue inicialmente incluido en la Familia Ixodidae (Bedford, 1931). Posteriormente, Hoogstraal (1985) y Oliver (1989) consideraron que se trataba de una nueva Familia que denominaron Nuttalliellidae, siendo *N. namaqua* la única especie identificada hasta la fecha.

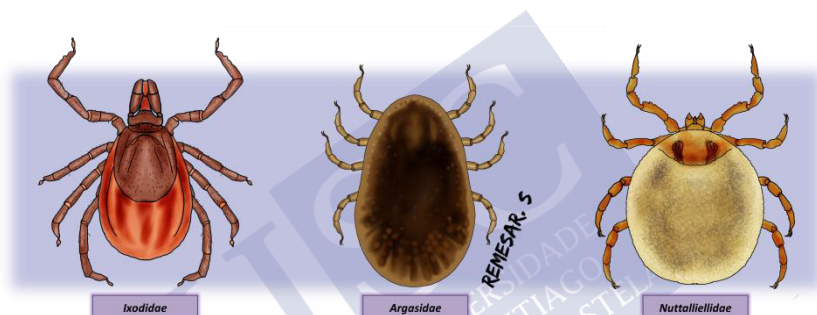


Figura 1.2. Ilustración de las tres Familias del Orden Ixodida

Aunque la mayoría de las garrapatas son parásitos obligados de otros animales, incluido el hombre, desde un punto de vista sanitario tiene más relevancia su actividad vectorial que el daño directo que pueden causar a sus hospedadores (Sonenshine, 1991). Aunque tanto los ixódidos como los argásidos pueden actuar como vectores de diferentes agentes patógenos, los ixódidos parecen reunir una serie de características que les confieren un mayor potencial como vectores, tanto a la hora de transmitir la infección a diversas especies como entre lugares alejados geográficamente. Esto se debe a que cada uno de los estadios de desarrollo de los ixódidos puede alimentarse de una amplia variedad de especies animales y, al presentar largos periodos de alimentación, pueden ser transportados de un lugar a otro sobre los animales que parasitan (Sonenshine, 1991).

El número de especies que integran cada uno de los géneros de la Familia Ixodidae y Argasidae, así como el número de hospedadores (H) que intervienen en su ciclo y los patógenos que pueden vehicular se resumen en las Tablas 1.2. y 1.3.

Tabla 1.2. Familia Ixodidae y patógenos que pueden transmitir

Género	Especies	Ciclo	Agentes patógenos
<i>Amblyomma</i>	130	3 H	<i>Coxiella burnetii</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Rickettsia</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Borrelia lonestari</i> , <i>Borrelia turcica</i>
<i>Anomalohimalaya</i>	3	3 H	-
<i>Bothriocroton</i>	7	1 H	-
<i>Compluriscutula</i>	1	-	-
<i>Cornupalpatum</i>	1	-	-
<i>Cosmiomma</i>	1	-	-
<i>Dermacentor</i>	34	1-3 H	<i>Rickettsia</i> spp., <i>Francisella tularensis</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Babesia</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp., <i>Theileria equi</i> , Virus de la fiebre por garrapatas del Colorado, <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Powassan virus</i> , Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk
<i>Haemaphysalis</i>	166	3 H	<i>Babesia</i> spp., <i>Theileria</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp.
<i>Hyalomma</i>	27	2 H	<i>Babesia</i> spp., <i>Theileria</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., Virus de la fiebre hemorrágica del Congo
<i>Ixodes</i>	243	3 H	<i>Babesia</i> spp., Virus del Louping-ill, <i>Rickettsia</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Borrelia</i> spp., Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> , <i>Ehrlichia walkerii</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Bartonella henselae</i> , <i>Powassan virus</i>
<i>Margaropus</i>	3	-	-
<i>Nosomma</i>	2	-	-
<i>Rhipicentor</i>	2	-	-

Tabla 1.2. (continuación)

Género	Especies	Ciclo	Agentes patógenos
<i>Rhipicephalus</i>	82	2-3 H	<i>Babesia</i> spp., <i>Theileria</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp., Virus de la enfermedad de Nairobi, <i>Rickettsia</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Hepatozoon canis</i> , <i>Dipetalonema</i> spp.

Tabla 1.3. Géneros de la Familia Argasidae y patógenos que pueden transmitir

Género	Especies	Agentes patógenos.
<i>Antricola</i>	17	-
<i>Argas</i>	61	<i>Borrelia anserina</i> , <i>Aegyptionella pullorum</i>
<i>Nothoaspis</i>	1	-
<i>Ornithodoros</i>	112	<i>Borrelia</i> spp., Virus de la peste porcina africana, <i>Babesia meri</i>
<i>Otobius</i>	2	-

1.1.2. Anatomía

Se describe exclusivamente la anatomía externa de las garrapatas ya que ésta es importante a la hora de realizar una correcta identificación de las mismas; además esta descripción se centrará especialmente en las garrapatas de la Familia Ixodidae por ser objeto de la presente Tesis. La anatomía externa de las garrapatas es diferente en función de su estadio y de si éstas se han alimentado o no. De manera general, las larvas se caracterizan por presentar tres pares de patas y carecer de apertura genital; las ninfas tienen cuatro pares de patas y también carecen de apertura genital; mientras que los adultos, además de los cuatro pares de patas presentan apertura genital. Las hembras presentan un escudo (*scutum*) en la región anterior, mientras que, los machos tienen un escudo similar al anterior que cubre la mayor parte de su superficie dorsal y se denomina “*conscutum*” (Walker *et al.*, 2003).

El cuerpo de las garrapatas se encuentra dividido en dos partes o tagmas, la parte anterior o capítulo se denomina gnathosoma y la parte posterior idiosoma. En la Figura 1.3. se ilustran las diferentes partes de los ixódidos en una garrapata modelo.

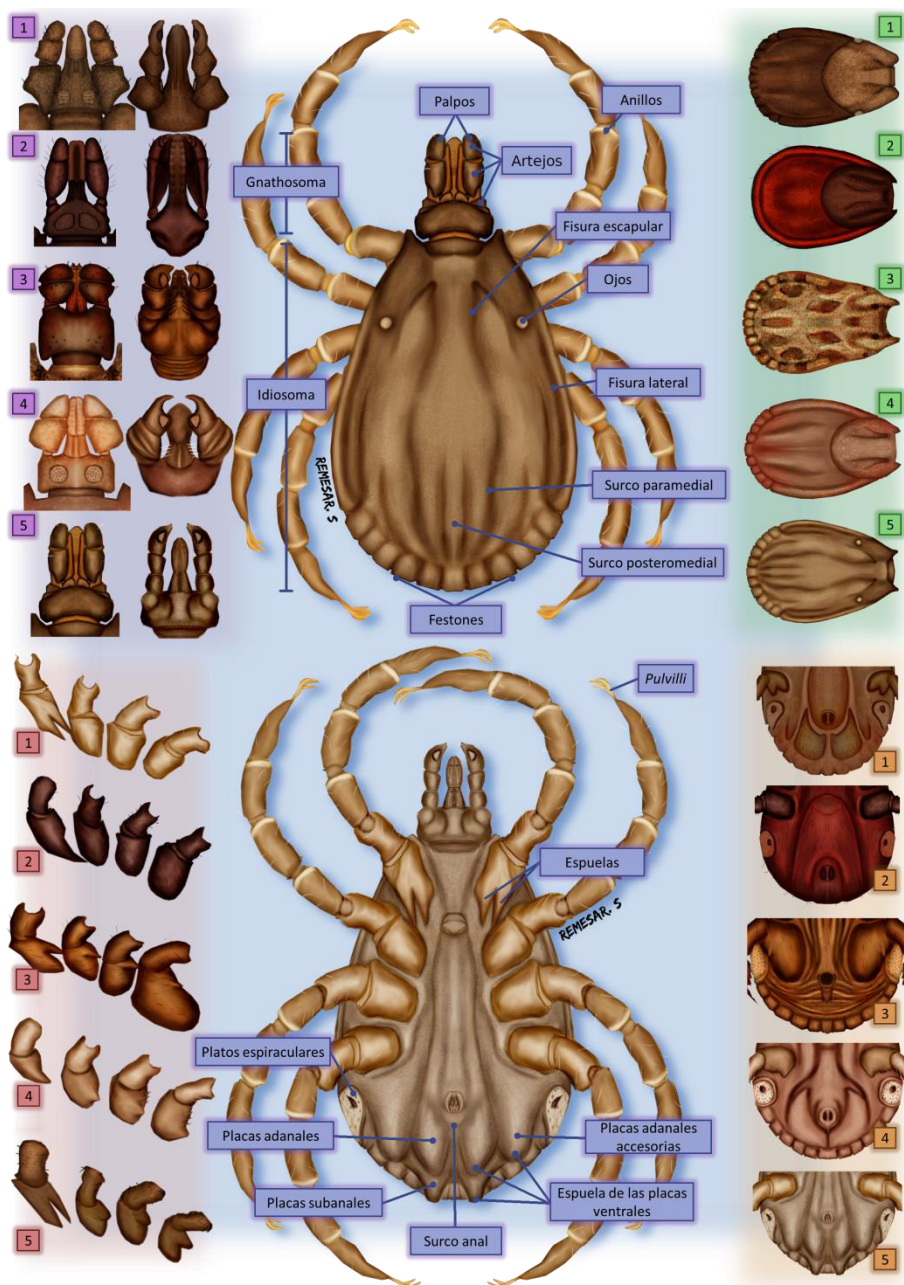


Figura 1.3. Diversas estructuras de las garrapatas Ixodidae presentes en España, vistas dorsal y ventral. 1) *Rhipicephalus*; 2) *Ixodes*; 3) *Dermacentor*; 4) *Haemaphysalis*; 5) *Hyalomma*

Mediante observación al microscopio electrónico de barrido de un Ixódido (Figura 1.4.) se puede apreciar que cerca de la base del gnathosoma se encuentran un par de palpos simétricos; ventralmente se sitúa el hipostoma y dorsalmente dos quelíceros. Los palpos presentan una función estrictamente sensorial y están formados por cuatro artejos (palpoartículos). Los quelíceros están compuestos de un cuerpo y varios dedos con garras con los que las garrapatas cortan la superficie de la piel del hospedador, mientras que, el hipostoma es el órgano de anclaje a la piel de éste y está compuesto por varias filas de denticulos que se dirigen hacia la parte posterior de la garrapata.

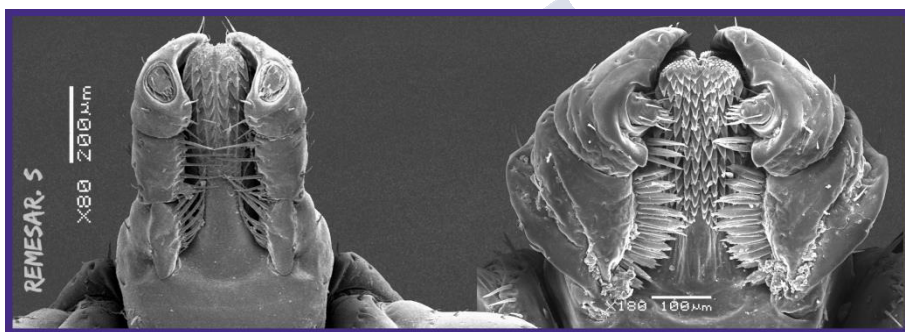


Figura 1.4. Observación al microscopio electrónico de las estructuras que componen el gnathosoma

Cuando la garrapata se está alimentando, tanto el hipostoma como los quelíceros atraviesan la piel del hospedador, mientras que los palpos se mantienen sobre la superficie de ésta. Para fijarse mejor a la piel del hospedador (Figura 1.5.), estos arácnidos segregan un líquido denominado cemento que sella el hipostoma y los quelíceros a la epidermis (Estrada-Peña, 2015).

El idiosoma es el tagma posterior de las garrapatas, la unión de éste con el tagma anterior forma dos ángulos laterales denominados escápulas. El aspecto del tegumento del idiosoma es diferente en los argásidos y en los ixódidos presentando estos últimos un tegumento formado por unas partes flexibles de aspecto liso y otras zonas esclerotizadas; y es debido a la existencia de estas zonas

esclerotizadas por las cuales han sido denominadas “garrapatas duras”.

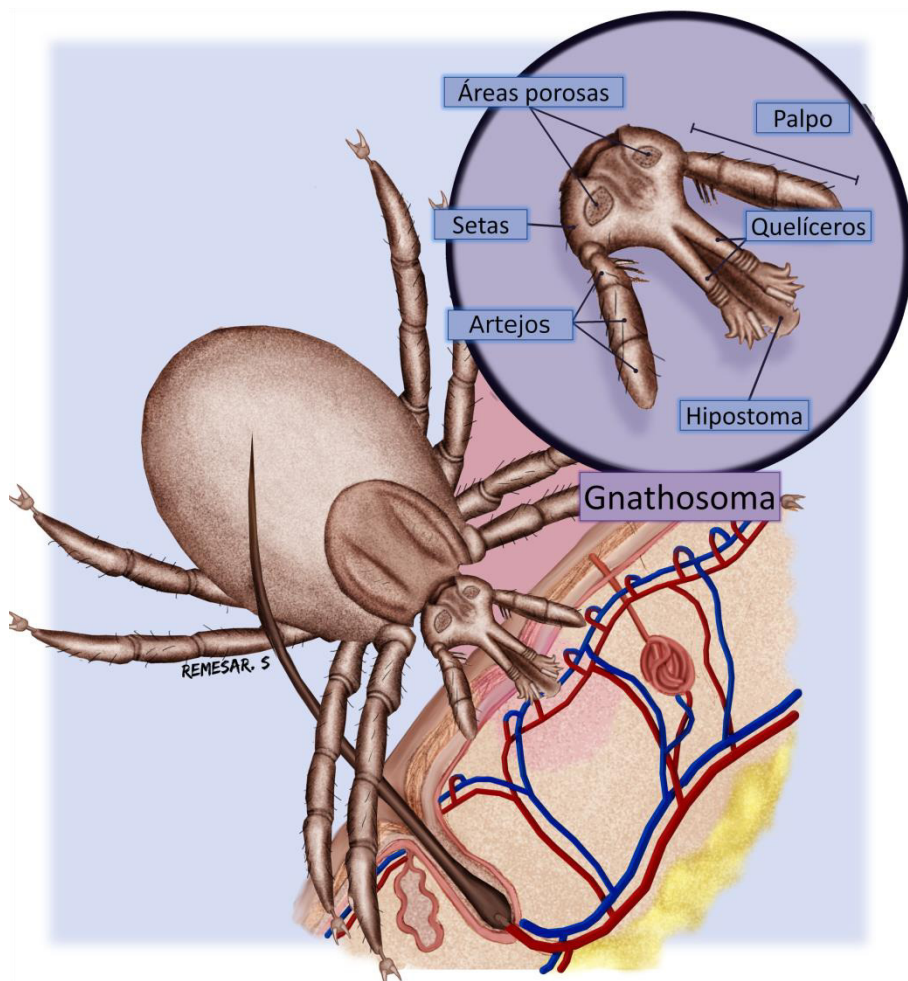
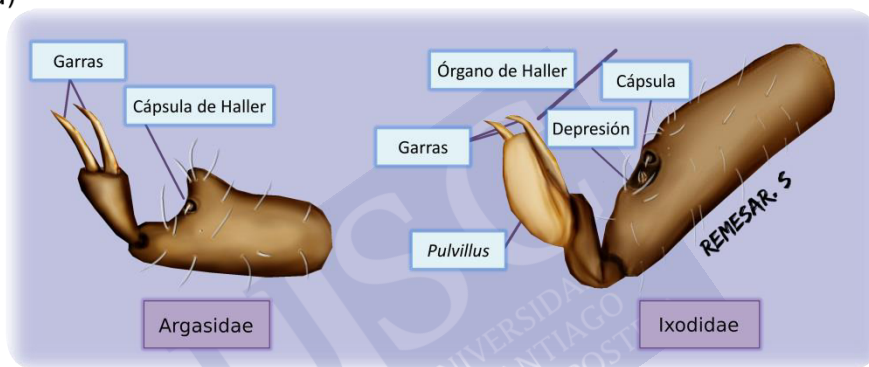


Figura 1.5. Anclaje de las garrapatas a la piel del hospedador

Cada una de las patas de los ixódidos está compuesta por seis artículos y un par de uñas unidas por una ventosa o “*pulvillus*” (Figura 1.6.). Los tarsos del primer par de patas presentan en la cara dorsal un órgano sensorial denominado “órgano de Haller” que utilizan para localizar a su hospedador mediante la detección de diversas feromonas. Este órgano es exclusivo de los ixódidos y está formado

por una cápsula y una depresión rodeada por un pliegue cuticular; alrededor de esta estructura se encuentran pequeños grupos de setas (Figura 1.6.). Gracias a estos órganos, las garrapatas pueden detectar ciertas moléculas producidas durante la respiración o a través de las secreciones cutáneas de los vertebrados como el anhídrido carbónico o los ácidos hialurónico, láctico y pelargónico, lo que les permite orientarse en el ángulo adecuado para ponerse en contacto con un hospedador (Estrada-Peña, 2015).

a)



b)

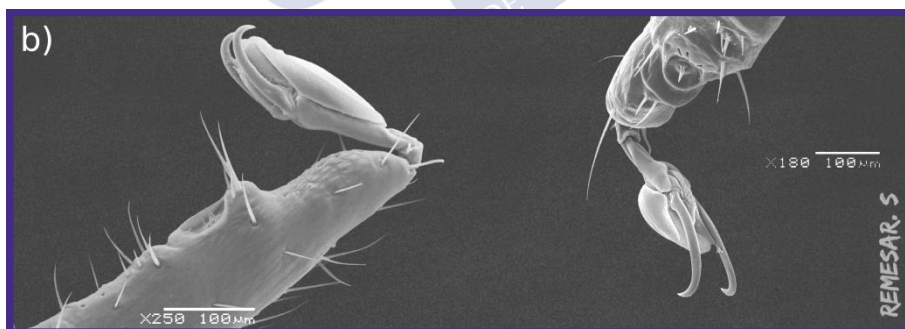


Figura 1.6. Esquema del primer par de patas de argásidos e ixódidos (a) y fotografía del primer par de patas de los ixódidos al microscopio electrónico de barrido (b)

1.1.3. Fenología de las garrapatas y su influencia en la transmisión de enfermedades

El “estudio de los fenómenos biológicos en relación con el clima, particularmente con los cambios estacionales” se denomina fenología (Real Academia Española; RAE). Por lo que si nos referimos a las garrapatas, se puede considerar que la fenología es el estudio de la estacionalidad y abundancia de estos arácnidos tanto en relación al clima como a otras variables.

En relación con el clima, las garrapatas son capaces de adaptar su ciclo biológico a los cambios climáticos que acontecen en las diferentes estaciones, desarrollando para ello mecanismos de diapausa que les permiten reducir su actividad cuando las condiciones climáticas no son las adecuadas (Randolph, 2000; Walker *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2016).

Es importante tener en cuenta que la actividad de las garrapatas se encuentra regulada principalmente por los cambios en su microclima; de hecho, la temperatura y la humedad que hay cerca del suelo y en lo alto de la vegetación les afecta más que las variaciones del clima en una región geográfica determinada. No obstante, existe una relación entre las condiciones climáticas estándar y la actividad de las garrapatas, aunque estas relaciones suelen presentar limitaciones (Corson *et al.*, 2004; Bisanzio *et al.*, 2008; Estrada-Peña y de la Fuente, 2014). De este modo, los veranos con temperaturas elevadas y una baja humedad ocasionan un aumento en la tasa de mortalidad de las garrapatas, especialmente de aquellas que se encuentran en lo alto de la vegetación o de las que se encuentran realizando un proceso de ecdisis (muda). Por el contrario, los inviernos con temperaturas muy bajas afectan negativamente a las garrapatas que están en el suelo, aunque, en ocasiones la nieve pueda tener un efecto protector de las poblaciones de garrapatas frente a las bajas temperaturas (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014; Alonso-Carné *et al.*, 2016). Por todo ello, se considera que existen dos momentos críticos en la vida de una garrapata en los que su desarrollo puede verse afectado por el clima. El primero es la muda o la ovoposición y el segundo es la búsqueda de

un hospedador. Las variables que más influyen sobre estos procesos son la temperatura, la humedad relativa, el déficit de saturación y el fotoperiodo (Rudolph *et al.*, 1974; Kahl *et al.*, 1988; Perret *et al.*, 2000; Estrada-Peña y de la Fuente, 2014). En ese sentido, Estrada-Peña y de la Fuente (2014) estudiaron la posible relación existente entre las diferentes combinaciones de temperatura y humedad relativa durante las etapas de desarrollo de las garrapatas, aunque todavía no se ha determinado cómo cada una de estas variables influiría sobre el ciclo de vida de las garrapatas a largo plazo. Según estos autores, la temperatura está relacionada con el desarrollo de los diferentes estadios, ya que actúa sobre la regulación del ciclo vital de la garrapata. Las bajas temperaturas del invierno provocan que el desarrollo de las garrapatas sea menor, mientras que el aumento de las temperaturas en primavera provoca que se complete la muda y que muchas garrapatas asciendan por la vegetación en busca de un hospedador. No obstante, el efecto de la temperatura no es igual en todo el mundo; de este modo, en los climas fríos la temperatura sí parece ser una variable que produce cambios significativos en la fenología de las garrapatas. Por el contrario, en los climas secos, es la disponibilidad de agua la que tiene mayor importancia. Así mismo, el fotoperiodo también influye sobre la muda, de este modo, cuando una garrapata completa su alimentación y cae al suelo antes del inicio del invierno, la muda posiblemente no se completará hasta el inicio de la primavera siguiente. Por el contrario, la humedad relativa y el déficit de saturación parecen estar estrechamente relacionados con los periodos de búsqueda de un hospedador y, por lo tanto, con la mortalidad de las garrapatas. Esto puede observarse cuando una garrapata se sitúa en lo alto de la vegetación; en esta situación es más sensible a la pérdida de agua por lo que es necesario que, en determinados momentos, descienda a las capas más bajas de la vegetación donde la humedad relativa es mayor.

Aunque el clima tiene una gran influencia en el ciclo de vida de las garrapatas, la composición y la abundancia de los hospedadores también influyen en su ciclo vital y ambas variables se encuentran

interrelacionadas (Randolph y Rogers, 2000). De este modo, el clima influye sobre la altura de la vegetación en la que se localizan las garrapatas determinando, en cierto modo, el rango de hospedadores de los que se va a poder alimentar. Cuando la humedad ambiental es baja la garrapata tiende a colocarse en capas de la vegetación más cercanas al suelo donde la humedad relativa es mayor siendo más probable que se alimente de animales de pequeño tamaño; por el contrario, si la humedad ambiental es elevada, la garrapata podrá permanecer durante más tiempo en lugares más elevados de la vegetación por lo que tendrá más facilidad para alimentarse de animales de mayor tamaño como los ungulados. Esto adquiere gran importancia cuando superponemos estos datos a los ciclos de transmisión de ciertas enfermedades, ya que no todas las especies animales pueden actuar como reservorios; en ese sentido se ha demostrado que los roedores y los pájaros suelen ser los principales reservorios de las enfermedades transmitidas por garrapatas, mientras que los ungulados no suelen actuar como reservorios de estas enfermedades (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014).

Además, cada género de garrapata se ha adaptado a determinadas especies de hospedadores. Se considera que los hospedadores son adecuados cuando de ellos depende la supervivencia de las garrapatas, mientras que se denominan hospedadores de mantenimiento cuando su presencia es necesaria para que las garrapatas se reproduzcan (Walker *et al.*, 2003). Conocer el rango de hospedadores de una garrapata nos puede ayudar a su identificación, aunque es necesario tener en cuenta que aunque una garrapata tenga un determinado rango de hospedadores puede encontrarse, aunque sea solo temporalmente, en otros hospedadores.

Las garrapatas se clasifican en tres grupos dependiendo de si se alimentan de un mismo tipo de hospedador o de varios (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - *European Food Safety Authority*; EFSA):

- Especies monotrópicas: en las que tanto los adultos como los estadios inmaduros se alimentan de un solo tipo de hospedador. A este grupo pertenece, por ejemplo, *Rhipicephalus bursa*.
- Especies ditrópicas: los estadios inmaduros se alimentan de hospedadores diferentes a los adultos. En *Hyalomma marginatum* las formas inmaduras se alimentan de pequeños animales silvestres y los adultos de vacas, caballos, ovejas y cabras.
- Especies telotrópicas: los ejemplares inmaduros pueden alimentarse del mismo hospedador que los adultos o de otro hospedador diferente.

Sin embargo, la fenología de las garrapatas, especialmente cuando se superpone con los ciclos de transmisión de determinadas enfermedades, no puede explicarse exclusivamente mediante el estudio del clima o de los hospedadores, sino que hay que tener en cuenta otras variables como la fragmentación del hábitat o el contacto de las garrapatas infectadas con individuos susceptibles, entre otras.

La fragmentación o división del hábitat puede producirse de forma natural y, por tanto, lentamente, o rápidamente por la actuación humana. En general se considera que fragmentos de hábitat grandes, que permiten el paso de hospedadores de un lugar a otro, producen una dilución del grado de infección de las garrapatas. Sin embargo, cuando los fragmentos son pequeños y no existe contacto con los vertebrados de otras áreas pueden darse dos situaciones: que en ese fragmento no existiera un hospedador adecuado por lo que la tasa de infección sería baja, o que en él convivieran una población de hospedadores adecuados y una población de garrapatas con tasas de infección elevadas, lo que originaría que la prevalencia de ese patógeno en la población de hospedadores y de garrapatas fuera cada vez mayor (Estada-Peña y de la Fuente, 2014).

Por último, otra variable a tener en cuenta sería la posibilidad de que las personas entren o no en contacto con garrapatas infectadas. La realización de actividades al aire libre en las áreas que puedan resultar atractivas por la existencia de paisajes naturales o animales silvestres,

o el desarrollo de actividades que impliquen un contacto con el medio ambiente como la agricultura, hace que exista un aumento del riesgo de la transmisión de los patógenos a los humanos. Sin embargo, esto no tiene porqué indicar que en esa zona exista una mayor población de garrapatas ni que la tasa de infección de éstas o de los hospedadores sea mayor, simplemente nos indica que en estas áreas es más probable que las personas contacten con las garrapatas que, de encontrarse infectadas, podrían llegar a transmitir la enfermedad.

1.1.4. Ciclo biológico

La cópula de las garrapatas comienza con la introducción del aparato bucal del macho en el tracto genital de la hembra y la deposición de un espermátforo. En los ixódidos la maduración de los espermatozoides finaliza en el tracto genital de la hembra, pero en los argásidos este proceso tiene lugar antes de la introducción del espermátforo. Para evitar la deshidratación los huevos, estos se recubren con una sustancia formada en parte por la secreción de las glándulas porosas y del órgano de Gené (Mehlhorn, 2008).

Las garrapatas de la Familia Ixodidae presentan tres tipos de ciclos biológicos en función del número de hospedadores diferentes que necesiten para completar el ciclo:

-Ciclo biológico trifásico o de tres hospedadores, es el más frecuente (Figura 1.7.). Tras la ovoposición, las larvas se desarrollan en el interior de los huevos hasta su eclosión; una vez que ésta se ha producido, las larvas buscan un hospedador del que alimentarse (normalmente animales de pequeño tamaño) y, tras terminar la alimentación, se dejan caer al suelo donde mudan a ninfas. Las ninfas se alimentan una vez (normalmente de animales de pequeño tamaño) y vuelven a caer al suelo donde se esconden y realizan la muda a adultos (hembras o machos). La hembra se alimenta una sola vez (normalmente de animales de mayor tamaño) y tras la cópula, se suelta del hospedador, cae al suelo y realiza la puesta de huevos. Los machos pueden realizar varias alimentaciones, una o ninguna, y después de la copula mueren.

Este comportamiento está determinado por el género al que pertenece garrapata; en general, los machos de la Familia Ixodidae ingieren una pequeña cantidad de sangre para completar la espermatogénesis; sin embargo, los machos del género *Ixodes* no necesitan alimentarse, de hecho tienen las piezas bucales atrofiadas, por lo que la producción de espermatozoides se completa durante la muda de ninfa a adulto (Estrada-Peña, 2015).

Este ciclo puede tardar en completarse entre seis meses a varios años (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Jongejans y Uilenberg, 2004), siendo las condiciones climatológicas y la existencia de diapausa las que determinan que un estadio biológico pueda tardar en completarse hasta uno o dos años (Sonenshine, 1991).

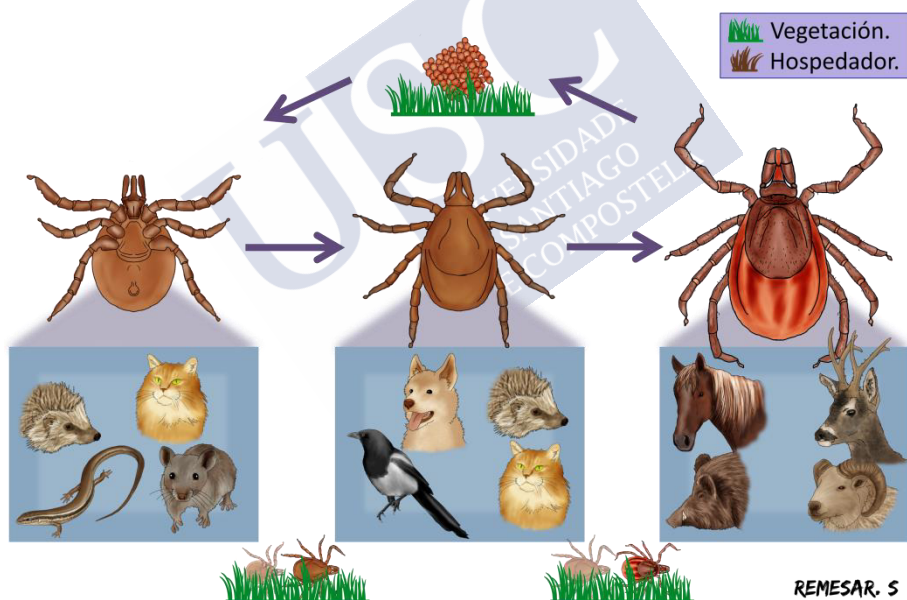


Figura 1.7. Ciclo biológico trifásico

-Ciclo biológico difásico o de dos hospedadores, donde las larvas y las ninfas se alimentan del mismo hospedador (Figura 1.8.). La muda de ninfa a adulto se realiza en el suelo y los adultos necesitan un segundo hospedador para alimentarse y posteriormente caer al suelo donde la hembra pone los huevos (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Jongejan y Uilenberg, 2004).

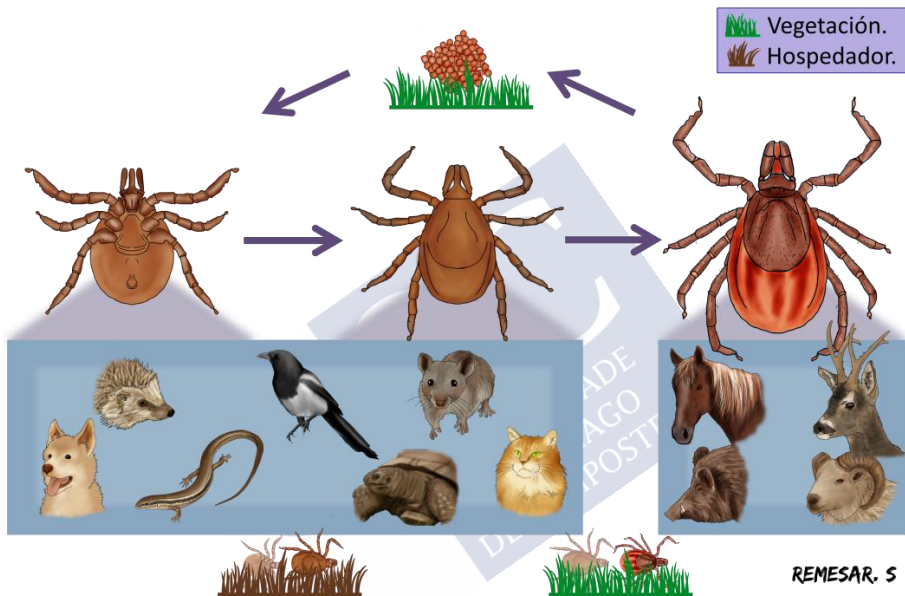


Figura 1.8. Ciclo biológico difásico

-El ciclo biológico monofásico o de un hospedador es el menos frecuente y es característico de algunas especies de garrapatas como *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. La hembra deposita los huevos en el suelo y posteriormente las larvas se desplazan por la vegetación para poder fijarse a un hospedador del que alimentarse (Figura 1.9.). Una vez que la larva se ha fijado al hospedador se alimenta de él y muda de larva a ninfa y tras la segunda alimentación de ninfa a adulto (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Jongejan y Uilenberg, 2004). Estas garrapatas, generalmente, parasitan al ganado vacuno o a ungulados

silvestres y el ciclo se completa en menos de 21 días (Estrada-Peña, 2015).

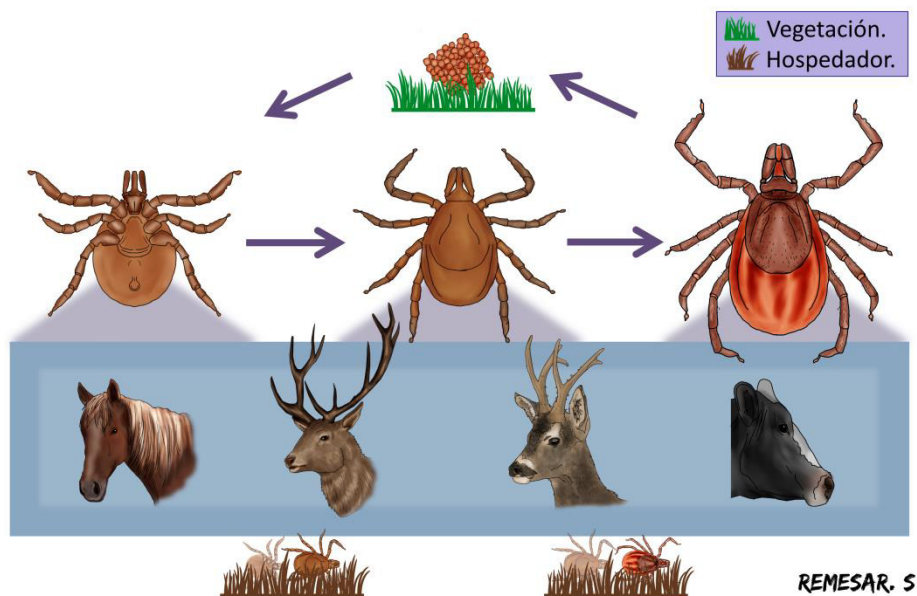


Figura 1.9. Ciclo biológico monofásico

Las garrapatas de la Familia Argasidae necesitan varios hospedadores para completar su ciclo y se desprenden después de cada alimentación para realizar la muda en el suelo (Figura 1.10.). Las larvas se alimentan una única vez antes de realizar la muda pero, al contrario que los ixódidos, los argásidos presentan varios estadios ninfales (entre 3 y 11) seguidos de su respectiva muda, cada una de ellas realizada en el suelo (Estrada-Peña, 2015). Tras la última muda ninfal se transforman en adultos y las hembras se alimentan repetidas veces y realizan varias puestas de huevos (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Jongejan y Uilenberg, 2004).

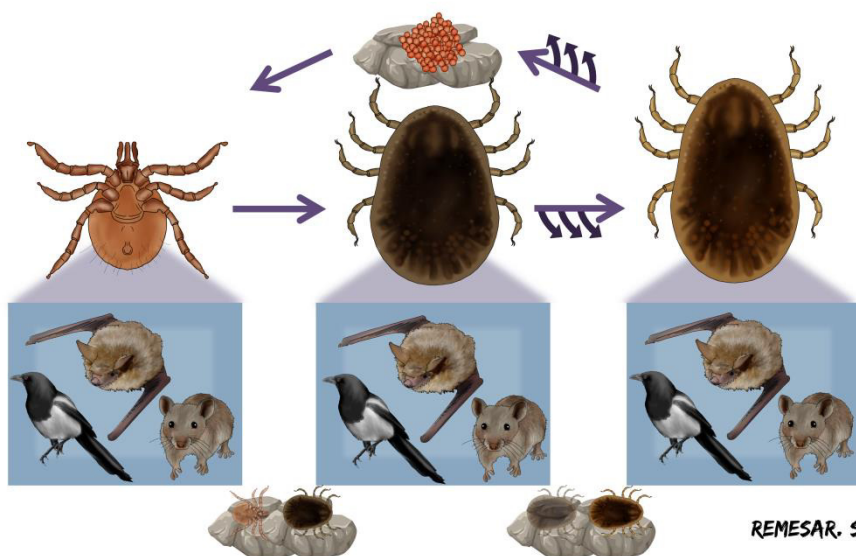


Figura 1.10. Ciclo biológico de los argásidos

1.1.5. Localización y fijación al hospedador

El comportamiento que utilizan las dos principales familias de garrapatas para encontrar un hospedador del que alimentarse es muy diferente. No obstante, ambas familias tienen en común la existencia de ciertos órganos sensoriales que les permiten detectar tanto la presencia de hospedadores o de otras garrapatas como las condiciones climáticas.

Los ixódidos alternan periodos de descenso y ascenso en la vegetación dónde, mediante el órgano de Haller, detectan la presencia de hospedadores. Después de la muda, las garrapatas se hidratan en las capas más profundas de la vegetación y cuando la temperatura sobrepasa los 7-9 °C ascienden por la vegetación colocándose a diferentes alturas de la misma, que oscilan entre varios centímetros hasta un metro. Esta situación hace que la garrapata pueda perder agua por lo que, cuando esta pérdida es demasiado elevada, la garrapata vuelve a descender hasta el suelo donde se rehidrata de forma pasiva. Sin embargo, esta rehidratación nunca es completa por lo que la garrapata siempre pierde agua; esto, junto a la pérdida de energía

producida, va acortando su vida de manera que si no encuentra pronto un hospedador podría llegar a morir. Sin embargo, las garrapatas cuentan con otra alternativa para poder sobrevivir, denominada diapausa. La diapausa es un estado fisiológico que está probablemente regulado por la cantidad de horas de luz diarias, de manera que cuando su número se reduce en el invierno, lo que suele coincidir con una reducción en el número de hospedadores, la garrapata entra en este estado, facilitando su supervivencia. Posteriormente, con el aumento de la temperatura y de las horas de luz, la garrapata se reactiva y sube a la parte alta de la vegetación, lo que favorece que encuentre un nuevo hospedador. Este estado puede considerarse como una diapausa de comportamiento de la garrapata; no obstante, también existen diapausas durante el proceso de muda, que puede detenerse, incluso durante varios meses, si la garrapata detecta una reducción del número de horas de luz diarias. La muda es un proceso que también depende de la temperatura, de manera que cuanto mayor sea la temperatura, más rápida es la muda.

Es importante remarcar que tanto la diapausa comportamental como la producida durante la muda dependen de las condiciones ambientales y no de la especie de garrapata, lo que implica que una misma especie puede o no realizar diapausa en función de las características climáticas del lugar donde habite. De este modo, en las regiones templadas y subárticas los cambios en el fotoperiodo, la incidencia de la luz solar y la temperatura influyen mucho en el comportamiento de las garrapatas; sin embargo, se ha sugerido que en las zonas tropicales, donde las variaciones de la duración del día y de temperatura son menos pronunciadas, la alternancia entre la estación seca y lluviosa es la que más influye sobre la actividad de las garrapatas (Estrada-Peña, 2015).

Los argásidos, debido a su ciclo de vida y a la posible ausencia de hospedadores en determinadas épocas del año, se tienen que adaptar a periodos de tiempo más o menos largos sin alimentarse; por este motivo, estas garrapatas consumen muy lentamente sus reservas de energía (Barandika, 2010). El proceso de alimentación en los

argásidos depende de su estadio, sexo y especie a la que pertenecen. De este modo, por ejemplo, las larvas presentan un periodo de alimentación más corto (3-5 días) que las ninfas (4-8 días) y los adultos (5-20 días).

Según el comportamiento mostrado por las diferentes especies de garrapatas, estas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

-Exófilas o no-nidícolas: viven en el suelo o en la vegetación, pudiendo encontrarse en bosques, sabanas, matorrales o praderas, así como enterradas en la arena o debajo de piedras, grietas, etc. Algunas de estas garrapatas, las denominadas “garrapatas cazadoras”, son capaces de buscar un hospedador, aproximarse y fijarse rápidamente a él; a este grupo pertenecen los géneros *Amblyomma* spp. e *Hyalomma* spp. Por el contrario, las denominadas “questing ticks” se desplazan sobre la vegetación y se colocan en la parte más alta de ésta, donde extienden sus patas delanteras y esperan a que algún animal se aproxime. Una vez se localizan sobre el animal, se desplazan sobre su piel hasta encontrar un lugar adecuado donde fijarse y alimentarse. Este comportamiento es propio de las larvas, las ninfas y los adultos de los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus* y *Haemaphysalis* (Barandika, 2010).

Las especies exófilas son capaces de protegerse de las condiciones ambientales extremas, de interpretar las señales externas que les permitan identificar la localización de un hospedador y de detectar cuáles son los periodos óptimos para iniciar la muda, la oviposición e incluso la diapausa. Además, han desarrollado otros mecanismos de adaptación frente a la desecación (Sonenshine, 1991).

-Endófilas o nidícolas: están escondidas en el lugar donde vive su hospedador, como nidos, madrigueras o cuevas, y solamente salen de sus escondites para alimentarse. Este comportamiento lo presentan las garrapatas de la Familia Argasidae y algunas especies de la Familia Ixodidae. Los diferentes estadios, una vez que se han alimentado de su hospedador, se desprenden de él y se

esconden en nidos o madrigueras, aumentando así su supervivencia (Estrada-Peña, 2015). Frecuentemente estas garrapatas requieren condiciones de temperatura y humedad óptima que dependen de la especie, teniendo por tanto un patrón de comportamiento inflexible que contribuye a mantenerse en el hábitat elegido, evitando así las condiciones atmosféricas que impliquen su desecación; además presentan fototropismo negativo.

1.1.6. Métodos de captura

Las técnicas de captura de las garrapatas son fundamentalmente de tres tipos: pasiva o por contacto directo con la vegetación, atracción a distancia y recogida de garrapatas fijadas a los hospedadores (Barandika, 2010). Estos métodos se emplean en estudios de vigilancia epidemiológica en una determinada zona o sobre un animal u hospedador concreto; así mismo, se utilizan cuando se desea conocer la distribución de las diferentes especies de garrapatas en una localidad o en un área en particular y para determinar la actividad estacional y la abundancia de las mismas.

-Método de captura pasivo o por contacto directo con la vegetación: es el método más utilizado para recoger garrapatas exófilas no alimentadas. Se consideran dos modalidades en este tipo de muestreo, el bandereo o “*flagging*” y el de arrastre o “*dragging*” (Dantas-Torres *et al.*, 2013). En el primer caso la bandera es una pieza de tela, fijada a un mango largo, que se ondea sobre la vegetación; la tela puede ser de diferentes tejidos, aunque se recomienda la tela de mahón o la de tipo vaquero. Este método permite muestrear áreas de matorral y árboles donde otras técnicas directas presentan más dificultades. El método de arrastre es similar al anterior, pero se diferencia de éste en que la tela se arrastra mediante una cuerda o se sostiene por los extremos y se desliza por encima de la vegetación. Dantas-Torres *et al.* (2013) comprobaron que con ambas técnicas se recolectan las mismas especies de garrapatas, con la excepción de *R. bursa* y

Haemaphysalis concinna que únicamente se capturaron mediante “dragging” y “flagging” respectivamente. Estos sistemas de muestreo son más útiles en superficies con cubierta vegetal baja y uniforme, pero existen variantes de estos métodos cuando el terreno así lo requiere. Por ejemplo para el muestreo de vegetación muy alta y densa se puede usar una sábana cortada en tiras rectangulares.

Estas técnicas permiten obtener una estimación de la actividad de las garrapatas y así poder compararla con la obtenida en otros estudios realizados en diferentes lugares y periodos de tiempo. Además también permiten relacionar los resultados obtenidos con las diferentes características abióticas del medio (Estrada-Peña *et al.*, 2013). Sin embargo, su principal desventaja es la dificultad para capturar especies de “garrapatas cazadoras” como las pertenecientes a los géneros *Hyalomma* o *Amblyomma*. Además, tampoco son útiles para recolectar larvas ya que estas suelen estar en las zonas más bajas de la vegetación (Gray, 1985).

-Mecanismos de atracción a distancia: el más utilizado es la trampa de CO₂ que consiste en un contenedor térmico con unas aperturas en la parte inferior donde hay una plataforma con cinta adhesiva. La nieve carbónica se coloca en el interior del contenedor y el CO₂ se difunde por las aberturas, este gas atrae a las garrapatas y se quedan adheridas a la cinta adhesiva. Esta técnica es la recomendada para capturar garrapatas cazadoras, aunque no funciona para ciertas especies como *Dermacentor variabilis* o los adultos de *Ixodes dammini* (Ginsberg y Ewing, 1989; Sonenshine, 1993). Además, la necesidad de su fabricación, su transporte y la disponibilidad de la nieve carbónica hacen que sea una técnica más engorrosa que las de contacto directo sobre la vegetación.

-Obtención de las garrapatas directamente de sus hospedadores: esta técnica se realiza durante el proceso de alimentación de la garrapata y es necesario que la retirada de ésta se realice correctamente para obtener el gnathosoma completo. Para

lograrlo se debe colocar la punta de la pinza lo más próxima posible a la piel del animal, sujetando a la garrapata por el aparato bucal y traccionando hasta retirarla. Cuando los animales son aves o micromamíferos se suelen emplear redes o trampas para su captura.

La búsqueda y recolección de garrapatas nidícolas debe realizarse en los lugares donde se encuentran escondidas, como grietas, piedras, madrigueras, nidos, etc. Para ello se debe recoger parte de estos nidos y posteriormente colocarlos en un embudo, o utilizar mecanismos succionadores que, al mismo tiempo, permitan recoger y separar las garrapatas del resto de materiales.

1.1.7. Principales especies de garrapatas en Europa

a) *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus es la especie que presenta una distribución más amplia en Europa, especialmente en el Norte y en el Centro de este continente (Figura 1.11.), aunque su distribución es más reducida en los países de la cuenca Mediterránea como Francia, España, Italia, Grecia y Portugal (Estrada-Peña, 2004).

Esta garrapata es exófila y su ciclo vital se completa con tres hospedadores. Muchos animales pueden actuar como sus hospedadores; los estadios inmaduros suelen alimentarse de pequeños mamíferos, pájaros y reptiles, mientras que los estadios adultos se alimentan principalmente de grandes rumiantes como ciervos, corzos, vacas o perros y carnívoros silvestres. También puede parasitar al ser humano, principalmente su estadio ninfal. Se suele localizar en la región axilar y perineal de sus hospedadores (Estrada-Peña, *et al.*, 2014).

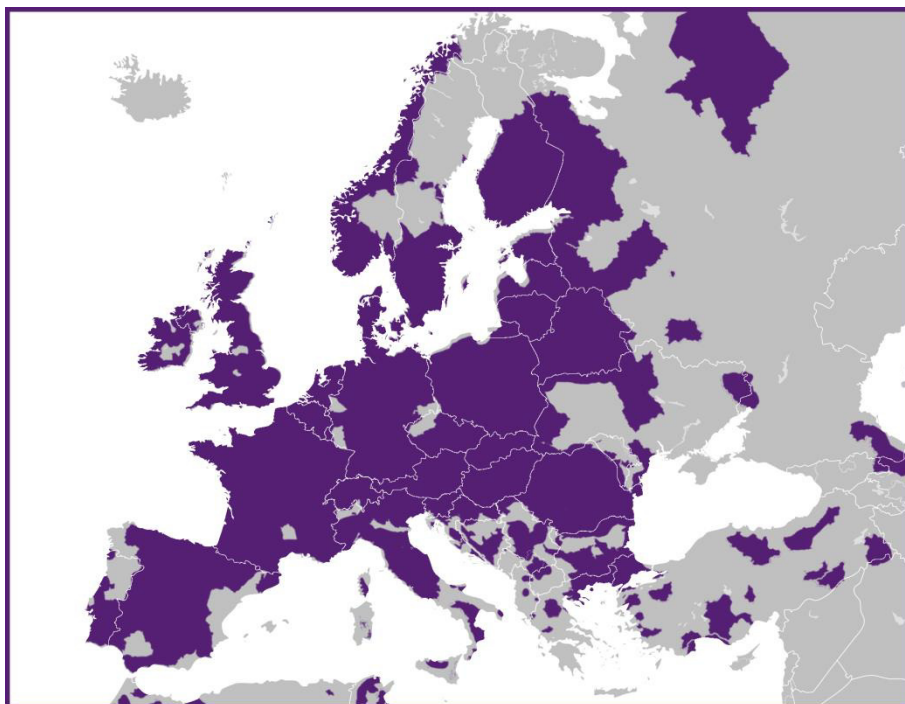


Figura 1.11. Distribución aproximada de *I. ricinus* en Europa

Su ciclo biológico suele completarse en tres años. Las larvas y ninfas están activas durante la primavera aunque, en ciertas zonas, algunas ninfas empiezan a estar activas antes de esta época del año; la actividad de ambos estadios comienza a decaer en el verano. Por el contrario, los adultos suelen estar activos prácticamente durante todo el año, especialmente entre octubre y mediados de marzo, siendo menos activos en los meses de verano. En general se considera que el momento del inicio de la actividad de las ninfas y de los adultos de *I. ricinus* tiene lugar cuando la media de la temperatura máxima diaria se aproxima de 7°C, mientras que las larvas necesitan una temperatura en torno a 10°C (Gray, 1985; Randolph *et al.*, 1995; Randolph *et al.*, 2002; Randolph, 2004; Gray *et al.*, 2008). La actividad de las ninfas y las larvas parece estar determinada por las condiciones climatológicas, siendo necesario que tras el periodo de inactividad invernal se

produzca un incremento rápido de la temperatura durante la primavera siguiente que permita el inicio de la actividad de ambos estadios. No obstante, las garrapatas pueden continuar activas cuando las temperaturas invernales no descienden por debajo de las señaladas anteriormente (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Kurtenbach *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2012; Cayol *et al.*, 2017).

La dinámica estacional de esta garrapata en España suele ajustarse a la reflejada a continuación (Figura 1.12.).

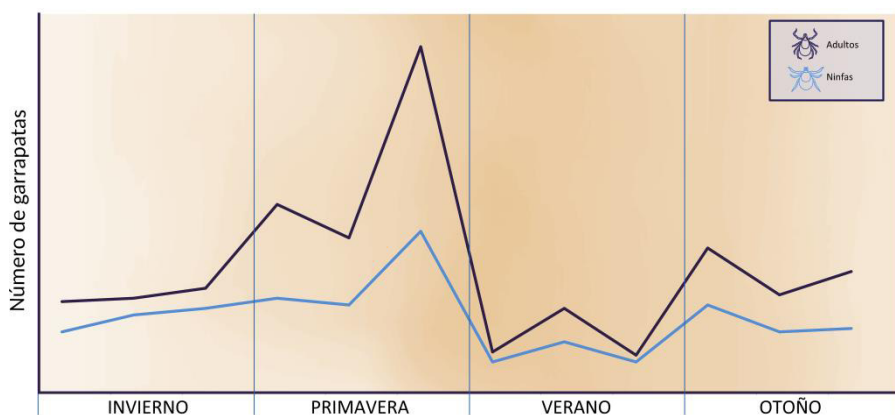


Figura 1.12. Dinámica poblacional de *I. ricinus* en España

Respecto a su morfología, *I. ricinus* se caracteriza por poseer un capítulo con palpos largos, carencia de ornamentación, presencia de una sola espuela interna en la coxa 1 y un surco anal anterior al ano. Sin embargo, su relativamente pequeño tamaño, junto con su similitud morfológica con otras especies como *Ixodes hexagonus*, así como la posible existencia de cruces interespecíficos entre ésta y otras garrapatas del mismo género, hace que su determinación taxonómica no sea sencilla (Estrada-Peña, 2015; Kovalev *et al.*, 2016).

Esta garrapata tiene una gran importancia no solo debido a su amplia distribución, sino a que transmite un elevado número de patógenos. Por este motivo el estudio de la actividad estacional de las poblaciones de esta especie presenta una gran importancia ya que

permite conocer las épocas del año de mayor riesgo de exposición a los patógenos que puede transmitir (Barandika, 2010). Entre las infecciones transmitidas por *I. ricinus*, en Europa (Tabla 1.4.) se encuentran la anaplasmosis, las babesiosis, la borreliosis o enfermedad de Lyme, ciertas rickettsiosis y la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG) entre otras (Estrada-Peña, 2015).

Tabla 1.4. Agentes patógenos detectados en garrapatas *I. ricinus* en Europa y su prevalencia

Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Alemania	3,8(N); 1,7(H); 2,5(M)	May y Strube, 2014
	Austria	0,72-5,1	Sixl <i>et al.</i> , 2003; Schötta <i>et al.</i> , 2017
	Bélgica	3,0	Lempereur <i>et al.</i> , 2012
	Bielorrusia	2,6	Reye <i>et al.</i> , 2013
	Bulgaria	2,2(N); 33,9(A)	Christova <i>et al.</i> , 2001
	Dinamarca	23,6	Skarphedinsson <i>et al.</i> , 2007
	Escocia	3-5,6	Walker <i>et al.</i> , 2001; James <i>et al.</i> , 2013
	Eslovaquia	8	Subramanian <i>et al.</i> , 2012; Derdakova <i>et al.</i> , 2003
	Eslovenia	0,6	Smrđel <i>et al.</i> , 2010
	España (centro)	0	Toledo <i>et al.</i> , 2009
	España (norte)	20,5-50	Barandika <i>et al.</i> , 2008; Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2012; Palomar <i>et al.</i> , 2015
	Estonia	2,7	Paulauskas <i>et al.</i> , 2012
	Finlandia	3,1(N); 9,2(A)	Sormunen <i>et al.</i> , 2016
	Francia	1,5-6	Reis <i>et al.</i> , 2011; Bonnet <i>et al.</i> , 2013
	Gales	7	Guy <i>et al.</i> , 1998
	Hungría	0,4	Egyed <i>et al.</i> , 2012
	Inglaterra	0,7(N); 3,4(H); 2,5(M)	Bown <i>et al.</i> , 2009
	Italia	1,5-9,9	Mantelli <i>et al.</i> , 2006; Capelli <i>et al.</i> , 2012
	Letonia	3	Paulauskas <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1.4. (continuación)

Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Lituania	2,9	Paulauskas <i>et al.</i> , 2012
	Luxemburgo	1,9	Reye <i>et al.</i> , 2010
	Noruega	4,6 (A); 0,8 (N)	Soleng y Kjelland, 2013
	Países Bajos	0,6	Wielinga <i>et al.</i> , 2006
	Polonia	4,9	Wójcik-Fatla <i>et al.</i> , 2009
	Portugal	4,0	Santos <i>et al.</i> , 2004
	Rep. Checa	4,15(N); 12,35(H); 16,1(M)	Venclikova <i>et al.</i> , 2014
	Rusia	13,4	Katargina <i>et al.</i> , 2012
	Serbia	3,7	Tomanovic <i>et al.</i> , 2013
	Suecia	1,5(N); 1,4(A)	Lommano <i>et al.</i> , 2012
	Suiza	6,6(N); 11,5(A)	Severinsson <i>et al.</i> , 2010
	Turquía	2,7-17,5	Sen <i>et al.</i> , 2011
	Ucrania	3,6	Movila <i>et al.</i> , 2009
<i>Babesia</i> spp.	Alemania	0,4-0,7	Schorn <i>et al.</i> , 2011
	Austria	2,7	Schötta <i>et al.</i> , 2017
	Bélgica	1,31	Lempereur <i>et al.</i> , 2011
	Bielorrusia	0,6	Reye <i>et al.</i> , 2013
	Eslovaquia	0,4	Svehlová <i>et al.</i> , 2014
	España	0,5	García-SanMartín <i>et al.</i> , 2008
	Estonia	1,4	Katargina <i>et al.</i> , 2011
	Finlandia	0,5	Laaksonen <i>et al.</i> , 2018
	Francia	0,5	Jouglin <i>et al.</i> , 2017
	Italia	0,45-8,6	Aureli <i>et al.</i> , 2015; Castro <i>et al.</i> , 2015
	Letonia	1,4	Capligina <i>et al.</i> , 2016
	Noruega	0,9	Oines <i>et al.</i> , 2012
	Polonia	4,6-15,2	Wojcik-Fatla <i>et al.</i> , 2015; Asman <i>et al.</i> , 2017
	Suecia	2,1(N); 1,1(A)	Lommano <i>et al.</i> , 2012
	Suiza	4,7(N); 2,8(A)	Karlsson y Andersson, 2016
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	Alemania	12,2(N); 6(H); 2,9(M);	Szekeres <i>et al.</i> , 2015
	Austria	25,63	Schötta <i>et al.</i> , 2017
	Eslovaquia	9,2(N); 14,8(A)	Pet'ko <i>et al.</i> , 1996
	Bielorrusia	14,1	Reye <i>et al.</i> , 2013
	España (centro)	25	Toledo <i>et al.</i> , 2009

Tabla 1.4. (continuación)

Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	España (norte)	1,7-22,23	Barandika <i>et al.</i> , 2008; Díaz <i>et al.</i> , 2017
	Finlandia	32,2	Junttila <i>et al.</i> , 1999
	Francia	10(N); 32(H); 20(M)	Reis <i>et al.</i> , 2011
	Hungría	40,8	Hornok <i>et al.</i> , 2014
	Italia	1,35-19,73	Castro <i>et al.</i> , 2015
	Lituania	25	Zygutienė <i>et al.</i> , 2003
	Noruega	31	Quarsten <i>et al.</i> , 2015
	Países Bajos	6,8	Wielinga <i>et al.</i> , 2006
	Polonia	6,1	Chmielewski <i>et al.</i> , 2011
	Reino Unido	7,7	Guy y Farquhar, 1991
	Rep. Checa	17,3	Kybicová <i>et al.</i> , 2017
	Suecia	10,30(N); 9,57(A)	Cathomas y Vorkommen, 2005; Lommano <i>et al.</i> , 2012
	Suiza	9-40	Jouda <i>et al.</i> , 2004
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Alemania	0,1(L); 2,8(N); 0(H); 4,3(M)	Szekeres <i>et al.</i> , 2015
	Bélgica	1,1	Cochez <i>et al.</i> , 2015
	Dinamarca	0,2-1,3	Michelet <i>et al.</i> , 2014
	España (norte)	0	Barandika <i>et al.</i> , 2008
	Estonia	0,4	Geller <i>et al.</i> , 2012
	Francia	2,2	Vayssier-Taussat <i>et al.</i> , 2013
	Inglaterra	0,3	Hansford <i>et al.</i> , 2014
	Irlanda	1,1	Pichon <i>et al.</i> , 2005
	Países Bajos	3,8	Cochez <i>et al.</i> , 2015
	Polonia	2	Kiewra <i>et al.</i> , 2014
	Rep. Checa	0,5	Crowder <i>et al.</i> , 2014
	Suecia	1,02	Lommano <i>et al.</i> , 2012
	Suiza	2	Wilhelmsson <i>et al.</i> , 2013
<i>Rickettsia</i> spp.	Alemania	51,9(M); 61,7(H); 52,1(N)	May y Strube, 2014
	Austria	16,78	Schötta <i>et al.</i> , 2017
	Bielorrusia	11,0	Reye <i>et al.</i> , 2013
	Dinamarca	1,7(N)	Kantsø <i>et al.</i> , 2010

Tabla 1.4. (continuación)

Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>Rickettsia</i> spp.	Eslovaquia	7,2(N); 10,6(H); 10,3(M)	Spitalská <i>et al.</i> , 2014
	España (centro)	12,5	Toledo <i>et al.</i> , 2009
	España (norte)	0	Barandika <i>et al.</i> , 2008
	Estonia	2,6(N); 8,5(A)	Katargina <i>et al.</i> , 2015
	Francia	5,8	Reis <i>et al.</i> , 2011
	Italia	0-32,89	Castro <i>et al.</i> , 2015
	Noruega	1	Quarsten <i>et al.</i> , 2015
	Polonia	9,8	Rymaszewska y Piotrowski, 2013
	Portugal	82,9	Milhano <i>et al.</i> , 2010
	Rep. Checa	2,85 (N); 3,65(H); 3(M)	Venclikova <i>et al.</i> , 2014
	Serbia	23,1	Radulovic <i>et al.</i> , 2011
	Suiza	9,5	Wallménius <i>et al.</i> , 2012
	Suecia	10,	Lommano <i>et al.</i> , 2012
	España	8,3	García-SanMartín <i>et al.</i> , 2008
<i>Theileria</i> spp.	Francia	0,2	Bonnet <i>et al.</i> , 2013

N: ninfas; H: hembras; M: machos; A: adultos

b) *Dermacentor* spp.

En Europa solamente se han identificado dos especies de *Dermacentor*: *Dermacentor marginatus* y *Dermacentor reticulatus*. La primera se distribuye desde la zona sur de Europa hasta el norte de Francia y desde el norte de Turquía y Siria hasta Rusia y China (Figura 1.13.). Además, también se ha hallado en el norte de África (Marruecos, Argelia y Túnez). Esta garrapata se distribuye por toda España y su hábitat predilecto son los valles, las zonas de arbustos y los bosques de especies frondosas, aunque se puede encontrar en altitudes de hasta 3.500 metros, se localiza preferentemente entre los 800 y 1.000 metros (Darvishi *et al.*, 2014).

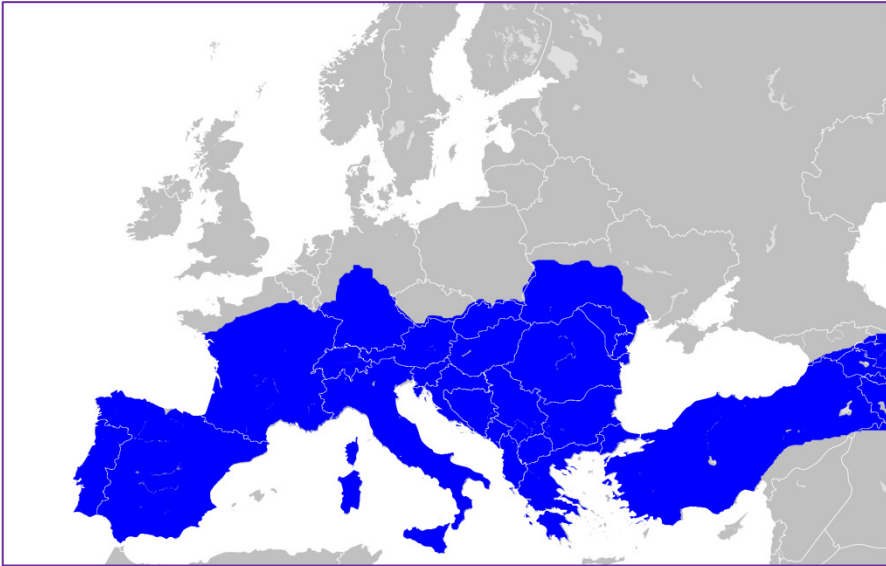


Figura 1.13. Distribución aproximada de *D. marginatus* en Europa

Como se aprecia en la Figura 1.14., la distribución de *D. reticulatus* en Europa se extiende desde el norte de Portugal y España hasta Asia Central encontrándose ausente en las zonas con clima Mediterráneo seco y en las zonas frías del norte de las islas británicas, Escandinavia y el norte de la región Báltica (Földvári *et al.*, 2016).

Su hábitat son espacios abiertos como pastizales y matorrales, en los que haya temperaturas templadas y elevadas humedades relativas (Nosek *et al.*, 1972). *Dermacentor reticulatus* es la segunda especie de garrapata más abundante en Europa central, solo superada por *I. ricinus* (Rubel *et al.*, 2014). La distribución de esta especie hace que en ocasiones comparta hábitat con *I. ricinus*, aunque *D. reticulatus* es más sensible a la desecación; no obstante, puede permanecer activa durante el invierno en zonas climáticas donde la temperatura es muy baja e *I. ricinus* no está activa.



Figura 1.14. Distribución aproximada de *D. reticulatus* en Europa

Las especies de *Dermacentor* presentes en Europa requieren tres hospedadores para completar su ciclo. Los adultos de estas especies parasitan grandes animales tanto domésticos como silvestres (vacas, ovejas, cabras, cérvidos, jabalíes o perros), por el contrario, los estadios inmaduros son ectoparásitos de animales de menor tamaño como roedores, pájaros y pequeños carnívoros. Además, su comportamiento varía en función del estadio. De este modo, los adultos son exófilos mientras que las fases inmaduras son endófilas, por lo que no se pueden recoger mediante la técnica del bandereo. El ciclo biológico puede completarse en 1 o 2 años y depende del tiempo que requieran los adultos para alimentarse. Normalmente, éstos permanecen activos desde finales de agosto-septiembre hasta abril-mayo, y su ciclo solo se interrumpe cuando los inviernos son muy

fríos (Dautel *et al.*, 2006). En la Figura 1.15. se refleja la dinámica estacional de *Dermacentor* spp. España (Barandika *et al.*, 2011).

Aunque ambas especies de *Dermacentor* se pueden encontrar sobre el mismo hospedador, se diferencian morfológicamente en que *D. reticulatus* tiene una espuela en los palpos que está ausente en *D. marginatus*. Otras estructuras que se utilizan para la identificación de *Dermacentor* son la forma de las áreas porosas y de los labios de la apertura genital de las hembras, así como, la forma del espacio delimitado entre la espuela interna y externa de la primera coxa de ambos sexos. La identificación de los estadios inmaduros es más complicada debido a que las larvas y las ninfas presentan una morfología similar a los estadios inmaduros del género *Rhipicephalus*, además, como se indicó anteriormente, los estadios inmaduros son nidícolas y no se capturan fácilmente mediante la técnica de bandereo (Földvári *et al.*, 2016).

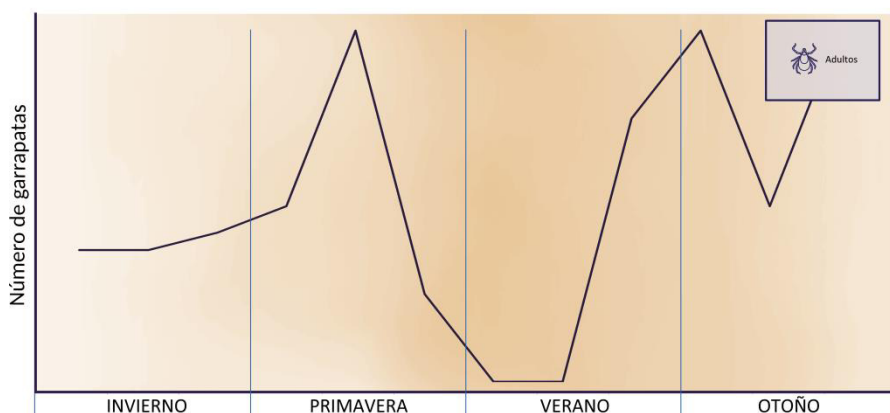


Figura 1.15. Dinámica estacional de las garrapatas del género *Dermacentor* spp. en España

En la Tabla 1.5. se resumen los principales patógenos transmitidos por las especies de *Dermacentor* identificadas en Europa. Epidemiológicamente, *D. reticulatus* se considera el principal vector de la fiebre hemorrágica de Omsk, *Babesia canis* y *Babesia caballi*, *Rickettsia slovaca* y *Rickettsia raoultii* mientras que *D. marginatus* lo

es de *R. slovacica* y *R. raoultii* que causan la denominada linfadenopatía transmitida por garrapatas (TIBOLA), así como de *Francisella tularensis* y del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Rubel *et al.*, 2016). Previamente, Parola *et al.* (2009) asoció la distribución geográfica de las enfermedades rickettsiales antes señalada con la distribución de las garrapatas del género *Dermacentor*.

Tabla 1.5. Agentes patógenos detectados en *D. reticulatus* y *D. marginatus* en Europa y su prevalencia

	Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>D. marginatus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	España (centro)	1,5	Toledo <i>et al.</i> , 2009
		Francia	3	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
	<i>Babesia</i> spp.	Francia	0,3	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
		Italia	0	Aureli <i>et al.</i> , 2015
	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	España (centro)	0	Toledo <i>et al.</i> , 2009
		Francia	0	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
	<i>Rickettsia</i> spp.	España (centro)	60	Toledo <i>et al.</i> , 2009
		Italia	24,3	Selmi <i>et al.</i> , 2017
	<i>Theileria</i> spp.	Francia	0,3	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
	<i>A. phagocytophilum</i>	Bielorrusia	0	Reye <i>et al.</i> , 2013
<i>D. reticulatus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	España	0	Barandika <i>et al.</i> , 2008
		Francia	0	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
		Lituania	8	Paulauskas <i>et al.</i> , 2012
		Polonia	0-2	Zajac <i>et al.</i> , 2017
		Serbia	1,9	Tomanovic <i>et al.</i> , 2013
		Bélgica	1,64	Jongejan <i>et al.</i> , 2015
		Bielorrusia	0	Reye <i>et al.</i> , 2013
	<i>Babesia</i> spp.	Eslovaquia	1,0(H);3,6(M)	Svehlová <i>et al.</i> , 2013
		Francia	0	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
		Polonia	0,7-5,2	Zajac <i>et al.</i> , 2017
	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Bielorrusia	2,7	Reye <i>et al.</i> , 2013
		España	0	Barandika <i>et al.</i> , 2008
		Francia	1,5	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
		Polonia	0-3,4	Zajac <i>et al.</i> , 2017
	<i>B. miyamotoi</i>	España	0	Barandika <i>et al.</i> , 2008

Tabla 1.5. (continuación)

	Patógeno	Zona	Prevalencia (%)	Referencia
<i>D. reticulatus</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	Bielorrusia	43,8	Reye <i>et al.</i> , 2013
		Eslovaquia	10,8	Svehlová <i>et al.</i> , 2013
		España (norte)	49,5	Barandika <i>et al.</i> , 2008
		Polonia	38,3-53,2	Zajac <i>et al.</i> , 2017
	<i>Theileria</i> spp.	Francia	0	Bonnet <i>et al.</i> , 2013

N: ninfas; H: hembras; M: machos; A: adultos

c) Otras especies de interés en Europa

Debido al impacto negativo que ocasionan sobre la salud animal *Hyalomma marginatum* y *Rhipicephalus sanguineus* también tienen gran interés. La primera especie es exófila y tiene un ciclo en el que intervienen dos hospedadores; se distribuye en zonas con clima mediterráneo, con temperaturas relativamente altas en verano y humedad ambiental baja. Esta garrapata puede transmitir *B. caballi* y *Theileria annulata*, pero su importancia epidemiológica se debe a la posibilidad de que pueda actuar como vector del virus de la fiebre hemorrágica del Congo.

Rhipicephalus sanguineus utiliza tres hospedadores para completar su ciclo. Esta especie se ha adaptado a vivir incluso en zonas de interior y en lugares cercanos a núcleos de población (Dantas-Torres, 2010). Su importancia como vector reside en que puede transmitir numerosos agentes patógenos a través de su picadura, como *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *B. canis*, *Babesia gibsoni* y *Anaplasma platys*. Además, cuando es ingerida también puede transmitir *Hepatozoon canis*. Sin embargo, el principal problema de esta garrapata es el gran número de individuos que componen sus poblaciones. (Dantas-Torres, 2010).

1.1.8. Especies de garrapatas identificadas en España

En función de la zona estudiada se ha comprobado que existe una gran diversidad en la distribución de las diferentes especies de garrapatas presentes en la Península aun cuando el método de captura es el mismo. En la Figura 1.16. se muestran los diferentes géneros de ixódidos presentes en España.

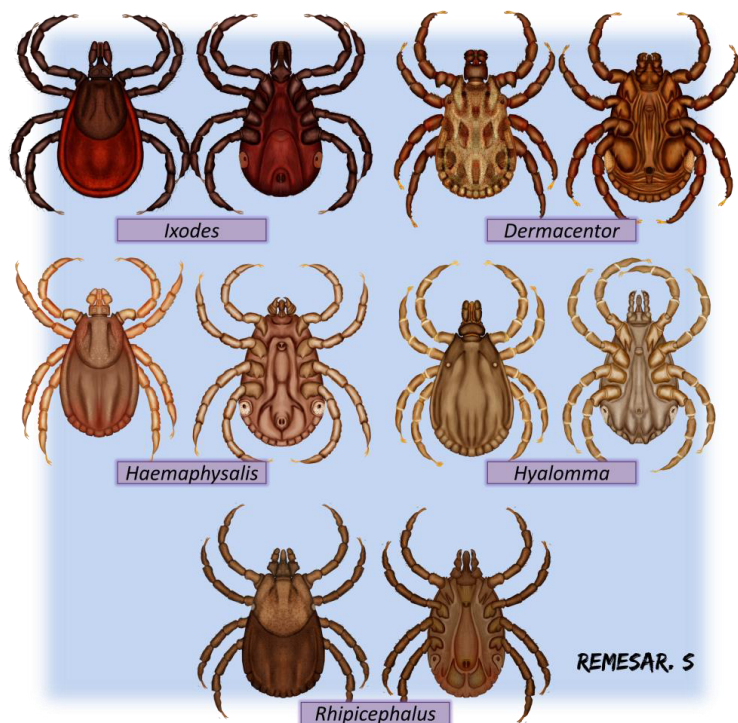


Figura 1.16. Principales géneros de ixódidos hallados en España

En el Norte de España se han realizado numerosas investigaciones. En La Rioja, Oteo *et al.* (2006) capturaron *H. marginatum* (83,3%) y *D. marginatus* (16,7%) mediante la técnica del bandereo. En dos estudios realizados en el País Vasco, Barandika *et al.* (2006) y García-SanMartín *et al.* (2008) hallaron especies de garrapatas similares pero con diferente abundancia; de este modo, Barandika *et al.* (2006) detectaron *I. ricinus* (34%), *Haemaphysalis punctata* (19,8%), *Haemaphysalis inermis* (15,5%), *Haemaphysalis*

concinna (4,27%), *R. bursa* (8,9%) y *D. reticulatus* (17,3%), mientras que García-SanMartín *et al.* (2008) hallaron una mayor variedad de especies, *I. ricinus* continuó siendo la más prevalente (58%), mientras que *H. punctata* (7%), *H. inermis* (4%), *Haemaphysalis sulcata* (2-4%), *R. bursa* (3%), *D. reticulatus* (3%), *Haemaphysalis hispanica* (1%), *R. sanguineus* (<1%) y *D. marginatus* (<1%) se detectaron en menor proporción. En un estudio realizado en el 2011 en esta misma región, las especies predominantes fueron *I. ricinus* (67%) y *H. punctata* (8%) (Barandika *et al.*, 2011). En Asturias, Espí *et al.* (2017) comprobaron que las especies más prevalentes eran *I. ricinus* (59,6%) y *H. concinna* (20,4%), seguidas de *H. punctata*, *D. reticulatus*, *H. inermis* y *R. bursa* (4-8%) y hallaron ocasionalmente *Ixodes frontalis*.

En el Centro de España también se han realizado varios estudios. En Castilla la Mancha, Fernández de Mera *et al.* (2013), mediante bandereo, señalaron prevalencias del 27,7%, 22,3%, 17,6%, 10,1%, 8,11%, 7,4%, 5,5% y 1,4% para *R. sanguineus*, *H. marginatum*, *R. bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *D. marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus pusillus* y *H. punctata*, respectivamente. En Madrid, Requena García *et al.* (2017) comprobaron que la especie más prevalente era *H. lusitanicum* (96,3%) y hallaron en menor proporción *D. marginatus* (2,2%), *R. pusillus* (0,9%) y *R. bursa* (0,6%). También en Madrid, Toledo *et al.* (2009) observaron que las especies más prevalentes eran *H. lusitanicum* (67,5%) y *D. marginatum* (25,5%), hallando menores porcentajes de *R. pusillus* (4,5%), *R. bursa* (1,5%), *I. ricinus* (0,8%) y *H. hispanica* (0,1%).

En el Sur de España, concretamente en Jaén, Márquez (2008) detectó las siguientes prevalencias: *R. bursa* (24,6%); *D. marginatus* (19,6%), *I. ricinus* (14,4%), *H. punctata* (10,7%), *H. sulcata* (10,3%), *H. lusitanicum* (9,9%), *R. sanguineus* (4,3%) e *I. hexagonus* (0,4%). Por el contrario, otros autores (Barandika *et al.*, 2011) observaron que las garrapatas predominantes eran *H. lusitanicum* (86%) y *D. marginatus* (12%).

En la Figura 1.17., se refleja la distribución geográfica aproximada de las garrapatas detectadas en España.

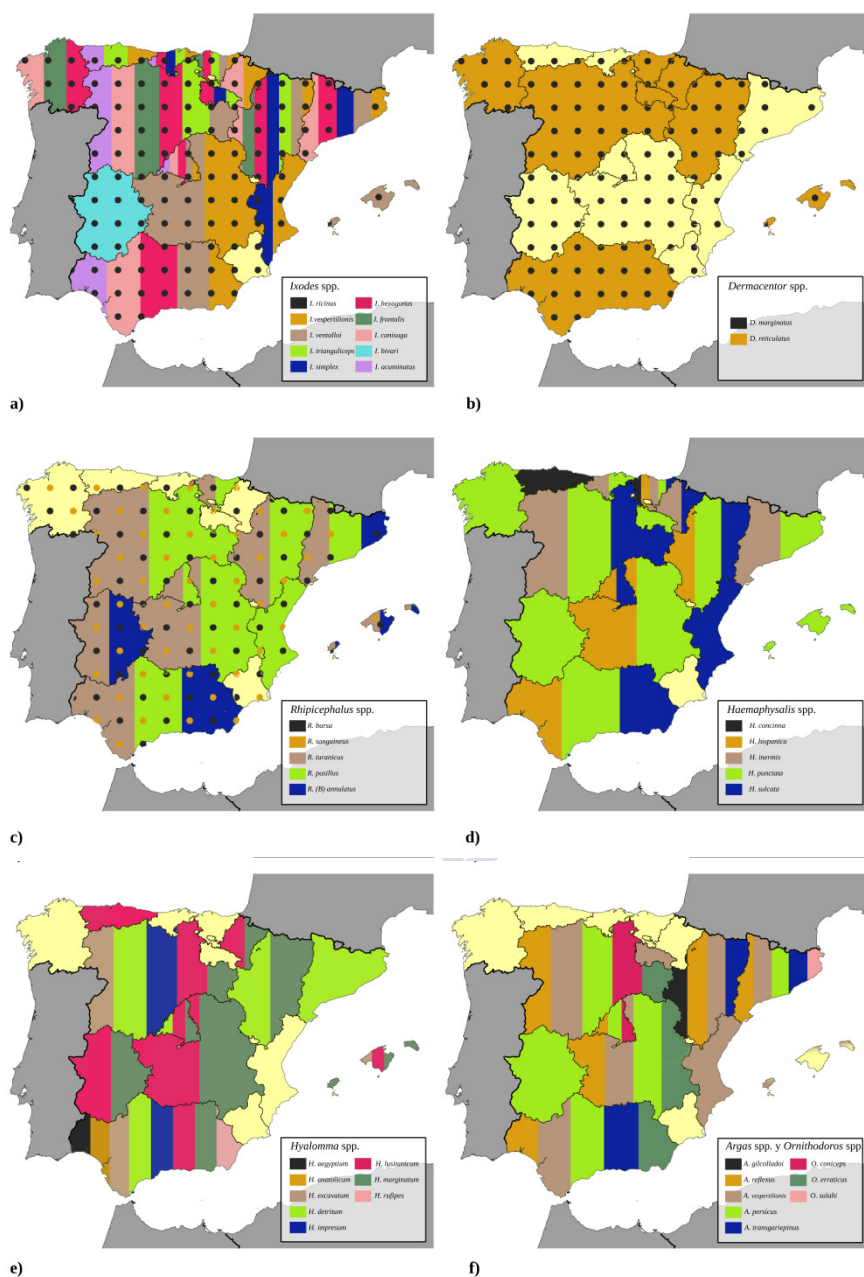


Figura 1.17. Distribución de las especies de garrapatas presentes en España: a) *Ixodes*; b) *Dermacentor*; c) *Rhipicephalus*; d) *Haemaphysalis*; e) *Hyalomma*; f) *Argas*/*Ornithodoros*

En la Tabla 1.6. se resumen las especies de garrapatas presentes en España indicando si se trata de una especie endófila o exófila y sus hospedadores principales.

Tabla 1.6. Especies de garrapatas, tipo de ciclo y principales hospedadores señalados en España

Género	Especie	Ciclo	Hospedadores
<i>Dermacentor</i>	<i>D. marginatus</i>	Exófila (adultos)	Ungulados, roedores, lagomorfos, perros
	<i>D. reticulatus</i>	Exófila (adulto)	Roedores, carnívoros, ungulados
<i>Haemaphysalis</i>	<i>H. concinna</i>	Exófila	Ungulados, aves, reptiles, roedores
	<i>H. hispanica</i>	Endófila	Lagomorfos, aves, ungulados, erizos, perros
	<i>H. inermis</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Ungulados, aves, reptiles, roedores
	<i>H. punctata</i>	Exófila	Ungulados, carnívoros, lepóridos, aves, reptiles, roedores
	<i>H. sulcata</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Ungulados, aves, reptiles, roedores
	<i>H. aegyptium</i>	Exófila	Tortugas de tierra, vaca, oveja, cerdo
<i>Hyalomma</i>	<i>H. anatolicum</i>	Exófila	Jabalíes
	<i>H. detritum</i>	Exófila	Vacas, cerdos
	<i>H. dromedarii</i>	Exófila	Dromedarios
	<i>H. marginatum</i>	Endófila/Exófila	Aves, ungulados, humanos, carnívoros
	<i>H. excavatum</i>	Exófila	Aves migratorias (posible importación), roedores, cerdos
	<i>H. impressum</i>	Exófila	Vacas
	<i>H. lusitanicum</i>	Endófila/Exófila	Lepóridos, ungulados, perros
	<i>H. rufipes</i>	Endófila/Exófila	Vacas
	<i>H. truncatum</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Vacas

Tabla 1.6. (continuación)

Género	Especie	Ciclo	Hospedadores
<i>Ixodes</i>	<i>I. arboricola</i>	Endófila	Aves
	<i>I. bivari</i>	Endófila	Conejo
	<i>I. canisuga</i>	Endófila	Carnívoros, jabalíes, ardillas
	<i>I. frontalis</i>	Exófila	Aves
	<i>I. hexagonus</i>	Endófila	Carnívoros, ovejas, erizos, perdices, murciélagos
	<i>I. inopinatus</i>	Exófila	Reptiles, carnívoros
	<i>I. ricinus</i>	Exófila	Aves, ungulados, humanos, carnívoros, roedores, lagomorfos, murciélagos
	<i>I. simplex</i>	Endófila	Murciélagos, micromamíferos
	<i>I. trianguliceps</i>	Endófila	Roedores
	<i>I. ventalloi</i>	Endófila	Roedores, lagomorfos, aves, carnívoros
	<i>I. vespertilionis</i>	Endófila	Murciélagos
<i>Rhipicephalus</i>	<i>R. annulatus</i>	Exófila	Ungulados, carnívoros, hombre
	<i>R. bursa</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Ungulados, lepóridos, carnívoros, erizo, hombre
	<i>R. guilhoni</i>	-	Carnívoros, vacas, ovejas, caballos, aves
	<i>R. sanguineus</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Carnívoros, humanos, ungulados, roedores, erizos
	<i>R. turanicus</i>	Endófila/Exófila (A) Endófila (L/N)	Ungulados, roedores, lepóridos, carnívoros, erizo
<i>Argas</i>	<i>A. gilcolladoi</i>	-	Buitres
	<i>A. persicus</i>	-	Aves
	<i>A. reflexus</i>	-	Aves
	<i>A. transgaripepinus</i>	-	Murciélagos
	<i>A. vespertilionis</i>	-	Murciélagos
<i>Ornithodoros</i>	<i>O. erraticus</i>	-	Roedores
	<i>O. coniceps</i>	-	-
	<i>O. maritimus</i>	-	Aves pelágicas

1.2. LAS GARRAPATAS COMO VECTORES

Las garrapatas son los artrópodos que actúan como vectores de un mayor número de patógenos (virus, bacterias, protozoos, hongos y nematodos). Además, pueden causar toxicosis, parálisis, irritación y alergia (Jongejan y Uilenberg, 2004). Para que la infección se pueda llevar a cabo, es necesario que el patógeno sea capaz de evadir los mecanismos de defensa de la garrapata desde que ingresa en el intestino del artrópodo hasta que se localiza en la hemolinfa, en los ovarios o en las glándulas salivales (Hajdušek *et al.* 2013).

Según Kahl *et al.* (2002), para que una especie de garrapata actúe como vector de un determinado patógeno es necesario que se alimente de un hospedador vertebrado, que adquiriera el patógeno durante la alimentación, que éste se mantenga durante uno o más estadios y que cuando la garrapata se vuelva a alimentar sea capaz de transmitir el patógeno a otros hospedadores. Por tanto, la mera detección de ADN de un patógeno en una especie de garrapata no significa que ésta actúe como su vector, ya que desconocemos la capacidad que presenta la garrapata para transmitir el patógeno. Del mismo modo, la detección de anticuerpos de un patógeno en un hospedador tampoco indica que este sea un reservorio de la enfermedad, sino que en algún momento de su vida ha estado en contacto con dicho patógeno (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014).

Las garrapatas pueden transmitir los patógenos por vía transtadial o transovárica. En el primer caso la transmisión se realiza de un estadio a otro, lo que supone que en las garrapatas de tres hospedadores los patógenos se pueden transmitir a dos hospedadores distintos, es decir, durante el proceso de alimentación de ninfas y adultos infectados. Por el contrario, en las garrapatas de dos hospedadores la transmisión solamente puede suceder durante el proceso de alimentación de un adulto infectado. La transmisión transovárica se produce cuando el agente patógeno puede invadir los ovarios de las hembras adultas y transmitirse a las larvas; esta vía de

transmisión permite que incluso las garrapatas de un solo hospedador puedan transmitir la infección entre distintos hospedadores (Bowman, 2011).

Así mismo, existen diferencias en la transmisión de los patógenos dependiendo de la Familia a la que pertenecen las garrapatas (Ixodidae o Argasidae). Así, los argásidos pueden transmitir los patógenos inmediatamente después de comenzar la alimentación, mientras que los ixódidos necesitan más tiempo, incluso días, para poder infectar a un hospedador. Estas diferencias pueden apreciarse en la transmisión de *Borrelia*, ya que las borrelias vehiculadas por garrapatas blandas pueden transmitirse a los pocos minutos de iniciar la alimentación, mientras que la transmisión de la enfermedad de Lyme, vehiculada por garrapatas duras, se produce como mínimo al cabo de 24 horas después del inicio de la alimentación (Sonenshine, 1991). Además de esta diferente forma de alimentación, debería tenerse en cuenta el número de hospedadores diferentes de los que se alimentan, lo que hace que sea más o menos relevante la transmisión transovárica o transestadial (Hajdušek *et al.*, 2013).

En Europa, los principales géneros de garrapatas de la Familia Ixodidae que tienen interés médico o veterinario son *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Haemaphysalis* (Heyman *et al.*, 2010) debido a que pueden transmitir bacterias como *Rickettsia*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Coxiella* y *Anaplasma*, virus como el virus del Louping ill y el de la encefalitis transmitida por garrapatas y hemoparásitos como *Babesia* y *Theileria* (Güner, *et al.*, 2004; Jongejan y Uilenberg, 2004; Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005; Araya-Anchetta, *et al.*, 2015; Bogovic, 2015). No obstante, los cambios debidos a la introducción de nuevos vectores, la proliferación de hospedadores adecuados, las modificaciones de las actividades humanas, los cambios edafo-climáticos, así como, la introducción de un patógeno nuevo o bien la mutación de uno antiguo, pueden modificar la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas en una zona y de esta forma, producir una emergencia, reemergencia o incluso la reducción de la prevalencia de dichas

enfermedades (Parola *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008; Halos *et al.*, 2010; Medlock *et al.*, 2013).

En la Figura 1.18. se esquematiza la transmisión de diversos patógenos a través de una garrapata exófila de tres hospedadores perteneciente a la Familia Ixodidae, al tener en cuenta su estadio, la época del año y los hospedadores de los que se alimenta. Los patógenos señalados son aquellos que, por su distribución geográfica o la de sus vectores, fueron objeto de estudio; éstos serán descritos en los siguientes subapartados de la presente Tesis doctoral.

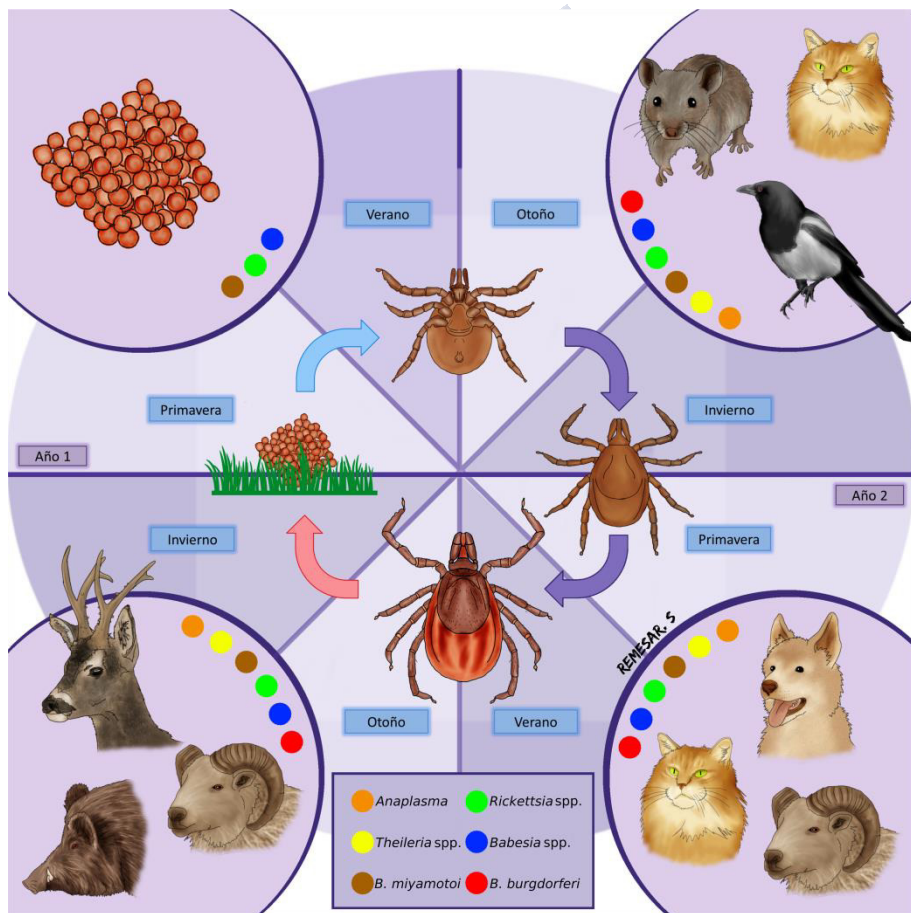


Figura 1.18. Transmisión de diversos patógenos por ixódidos al considerar su estadio, la época del año y los hospedadores

1.2.1. Anaplasmosis

El género *Anaplasma* pertenece a la Familia Anaplasmatadeae, Orden Rickettsiales y comprende seis especies: *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *A. ovis*. En la actualidad se han identificado nuevas especies como *Anaplasma capra* en cabras de China (Li *et al.*, 2015) y *A. odocolei* en ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y en ciervo sica (*Cervus nippon*) (Ybañez *et al.*, 2012; Tate *et al.*, 2013). Todas las bacterias del género *Anaplasma* spp. son cocos gram-negativos de pequeño tamaño (0,2-1,5 μm). Presentan una pared celular con escaso péptido-glucano y la membrana externa es fina y con abundantes pliegues, lo que permite diferenciarlas de otros géneros de la Familia Ehrlichiaeae como *Ehrlichia chaffeensis* y *Neorickettsia sennetsu* (Popov *et al.*, 1998).

Algunas de estas especies son agentes causales de varias enfermedades transmitidas por vectores con gran impacto sobre la salud humana y animal, en los que además pueden suponer una reducción de su productividad y, en consecuencia, grandes pérdidas económicas. De todas las especies de *Anaplasma*, las que presentan mayor importancia epidemiológica son *A. marginale* y *A. phagocytophilum* (Atif, 2015; Kocan *et al.*, 2015).

Anaplasma marginale causa la anaplasmosis ovina; se transmite a través de la picadura de *Rhipicephalus* spp. o mecánicamente por moscas, agujas y diversos utensilios utilizados en las granjas (Stuen 2007). Su distribución es mundial y tiene una gran importancia económica en el Sur de Europa, África, Asia, Australia y América Central y del Sur.

Anaplasma phagocytophilum es una alfa proteobacteria intracelular obligada de carácter zoonótico, que se transmite a través de la picadura de *Ixodes* spp. Es aerobia estricta e infecta a los neutrófilos del hospedador mediante un proceso de endocitosis. Tiene un amplio rango de hospedadores, entre los que se encuentran carnívoros, rumiantes, roedores, insectívoros, pájaros, reptiles y personas (Zeman y Pecha, 2008; Stuen *et al.*, 2013). Esta especie es causante de enfermedades como la fiebre transmitida por garrapatas

(“*Tick Borne Fever*”, TBF) y la anaplasmosis granulocítica humana (“*Human Granulocytic Anaplasmosis*”, HGA) cuyas incidencias han aumentado en los últimos años en Europa y en EE.UU. (Dugat *et al.*, 2015).

1.2.1.1. Epidemiología y epidemiología molecular

Anaplasma phagocytophilum se ha hallado en Europa, EE.UU., América del Sur y África (Walker, 2001). Se considera endémica o potencialmente endémica en 42 países, con una tasa de mortalidad del 5%. En Europa se diagnosticó por primera vez en 1997 en Eslovenia (Petrovec *et al.*, 1997) y desde entonces solo se han diagnosticado unos 100 casos; por el contrario la prevalencia en EE.UU. es mucho mayor. La seroprevalencia oscila entre el 1 y el 20%, observándose un aumento de la prevalencia entre junio y julio (Atif, 2015), siendo los grupos de mayor riesgo las personas que realizan actividades al aire libre y las inmunodeprimidas. En la actualidad la anaplasmosis humana se considera una zoonosis emergente, en España se ha podido detectar el patógeno en garrapatas *I. ricinus*, con prevalencias entre el 0 y el 50% (Barandika *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2012; Palomar *et al.*, 2015), pero en personas solamente se han declarado dos casos autóctonos (García *et al.*, 2015) siendo la seroprevalencia baja (1,4%; Oteo *et al.*, 2000) lo que podría deberse a la baja prevalencia de infección en *I. ricinus* de cepas de *A. phagocytophilum* patógenas para las personas (García *et al.*, 2015).

Como se ha señalado anteriormente, *A. phagocytophilum* puede infectar a diferentes especies de animales, aunque las diferentes cepas tienen predilección por uno o varios hospedadores (Bown *et al.*, 2009; Battilani *et al.*, 2017). Por este motivo se han realizado diversas investigaciones de caracterización molecular con la finalidad de demostrar esta aparente diversidad epidemiológica y la preferencia por el hospedador. Éstos se basan en el estudio de uno o múltiples locus o incluso en la secuenciación genómica completa (Cohan, 2001; Portillo *et al.*, 2005; Dugat *et al.*, 2015).

-La tipificación de un solo locus se basa en el estudio de un solo gen para determinar la diversidad genética de *A. phagocytophilum*. Los genes empleados con más frecuencia son el 16S *ARNr*, el operon *groESL* (Chen *et al.*, 1994; Sumner *et al.*, 1997), las proteínas mayores de superficie *msp2* y *msp4* y los genes *ankA* (Rar y Gozlojva, 2011). Aunque la secuenciación de estos genes nos puede dar información sobre el origen geográfico o el hospedador de procedencia, no se consideran buenos marcadores genéticos ya que sus resultados no siempre son comparables de una zona a otra, y no se conoce con exactitud su significancia ecológica y epidemiológica (Battilani *et al.*, 2017).

-La tipificación de múltiples locus ("*Multilocus Sequence Typing*", MLST) se basa en la amplificación y secuenciación de varios loci que constan de varios genes, normalmente siete (*pheS*, *glyA*, *fumC*, *mdh*, *sucA*, *dnaN* y *atpA*), obteniéndose diferentes alelos. Estos alelos se ordenan y combinan para la obtener un perfil que nos permite determinar la secuencia tipo del microorganismo estudiado (2877 pb). Aunque esta técnica presenta buenos resultados para la realización de estudios filogenéticos, no permite realizar estudios de trazabilidad (Battilani *et al.*, 2017) en los que se requiere el uso de otras técnicas como la "*Multiple Locus Variable Number Tandem repeat*" (VNTR), la "*Multiple Locus Variable Analysis*" (MLVA) y la secuenciación genómica completa (Dugat *et al.*, 2014).

1.2.1.2. Vectores

Como se señaló previamente, los principales vectores de *A. phagocytophilum* son garrapatas del género *Ixodes* spp. Sin embargo, la especie varía de un continente a otro; de este modo, *I. ricinus* es el principal vector en Europa, *Ixodes scapularis* en el este de EE.UU., *Ixodes pacificus* e *Ixodes spinipalpis* en el oeste de EE.UU. y en Asia, e *Ixodes persulcatus* en Rusia (Burkot *et al.*, 2001; Stuen *et al.*, 2013; Dugat *et al.*, 2015). Además, según Ogden *et al.* (1998) *Ixodes*

trianguliceps podría también tener relación con el mantenimiento de esta enfermedad en los roedores.

Aunque se ha detectado ADN de *A. phagocytophilum* en garrapatas *Amblyomma americanum* en Florida (Clark, 2012), en *I. pacificus* y *Dermacentor occidentalis* en California (Barlough *et al.*, 1997; Holden *et al.*, 2003), en *Dermacentor silvarum* en China (Cao *et al.*, 2006), en *Haemaphysalis megaspinosa*, *Haemaphysalis douglasii* e *Ixodes ovatus* en Japón (Wuritu *et al.*, 2009; Yoshimoto *et al.*, 2010; Ybañez *et al.*, 2013) y en *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes nipponensis* en Corea (Chae *et al.*, 2008), entre otras, no se ha podido comprobar su eficiencia como vectores (Stuen *et al.*, 2013). En la Tabla 1.7. se resumen las principales especies de garrapatas en las que se ha detectado ADN de *A. phagocytophilum* en Europa.

Tabla 1.7. Especies de garrapatas citadas en diferentes países europeos como posibles transmisoras de *A. phagocytophilum* (Stuen *et al.*, 2013)

Especies	Países
<i>D. reticulatus</i>	Lituania, Serbia
<i>H. concinna</i>	Serbia
<i>I. persulcatus</i>	Estonia, Letonia, Rusia
<i>I. ricinus</i>	Noruega, Suiza, Estonia, Letonia, Lituania, Rusia, Polonia, Eslovaquia, Bielorrusia, Ucrania, Moldavia, Bulgaria, Hungría, Serbia, Eslovenia, Escocia, Gales, Inglaterra, Bélgica, Luxemburgo, Francia, Alemania, Austria, Suiza, Italia, España, Portugal
<i>I. ventralloi</i>	Portugal

En España también se ha detectado ADN de *A. phagocytophilum* en otras especies diferentes a las anteriormente citadas. De este modo, en Castilla y León se aisló ADN de esta bacteria en adultos y ninfas de *R. sanguineus*, *H. lusitanicum* y *D. marginatus*, así como en adultos de *H. marginatum*, *R. bursa*, *D. reticulatus* y *H. punctata* (Fernández Soto, 2003). Además, en el País Vasco se han hallado adultos de *H. inermis*, *R. bursa* y *D. reticulatus* y ninfas y adultos de *I. ricinus* infectados, así como todos los estadios en *H. punctata* (Barral Lahidalga, 1998); en este último caso, la detección de ADN de *A. phagocytophilum* en larvas de *H. punctata* podría indicar también la

posible existencia de transmisión transovárica (Pérez-Sánchez *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta que *A. phagocytophilum* es una bacteria intracelular obligada y que un reservorio es el ambiente biótico o abiótico que permite el mantenimiento de un patógeno, la garrapata puede considerarse un reservorio si éste puede transmitirse de manera transovárica. Como se ha demostrado que *A. phagocytophilum* no se transmite de forma transovárica en sus vectores, éstos no pueden considerarse reservorios de la enfermedad. De todos modos, en EE.UU. se ha demostrado la transmisión transovárica en *Dermacentor albipictus* (Baldrige *et al.*, 2009), aunque todavía se desconoce si las larvas infectadas pueden transmitir esta bacteria a los hospedadores. Por todo ello, en general se considera que, aunque este tipo de transmisión existiera, debido a su escasa importancia en la persistencia de la bacteria, los reservorios de este patógeno son exclusivamente organismos vertebrados (Dugat *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Levin y Fish (2000), el 30% de las garrapatas positivas a *A. phagocytophilum* también lo fueron a *B. burgdorferi* s.l., siendo esta coinfección más frecuente en las garrapatas adultas. Estos autores sugirieron que es más frecuente que el vector se infecte con estas bacterias en dos tomas de sangre consecutivas, aunque también puede hacerlo de forma simultánea durante una única alimentación. Además, comprobaron que ambos patógenos podían transmitirse durante el proceso de alimentación de las garrapatas, lo que contribuiría a la aparición de coinfecciones también en los hospedadores.

1.2.1.3. Hospedadores

Se considera que *A. phagocytophilum* presenta diversos tipos de hospedadores y que muchos de ellos también pueden actuar como reservorios competentes de este patógeno. Sin embargo, parece que la mayoría de estos reservorios y hospedadores mantienen su propio ciclo cerrado junto a determinadas especies de garrapatas, si bien

algunos de estos ciclos epidemiológicos parecen encontrarse relacionados.

Las ovejas son el principal hospedador de *A. phagocytophilum* en Europa (Thomas *et al.*, 2012; Stuenkel *et al.*, 2013) ocasionándoles la enfermedad conocida como anaplasmosis granulocítica ovina (AGO), siendo reservorios de su propia variante (Dugat *et al.*, 2015). Así mismo, en muchas especies de rumiantes silvestres, especialmente cérvidos como corzos y ciervos rojos, la prevalencia oscila entre el 12 y el 85% (Portillo *et al.*, 2011; Overzier *et al.*, 2013; Malmsten *et al.*, 2014; Palomar *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Kauffmann *et al.*, 2017); no obstante, estos animales no se consideran reservorios de la enfermedad que afecta otras especies animales (perros, caballos o rumiantes domésticos) o a las personas pues, al igual que las ovejas, estos suelen estar infectados por su propia variante de *A. phagocytophilum* (Dugat *et al.*, 2014; Huhn *et al.*, 2014). Los roedores presentan una prevalencia de infección menor que los rumiantes silvestres (Stuenkel *et al.*, 2013) siendo posible la existencia de un ciclo epidemiológico en el que solamente actúen éstos como hospedadores vertebrados (Bown *et al.*, 2009) e *I. trianguliceps* como vector (Blaðaróv *et al.*, 2014). Sin embargo, los erizos y jabalíes, que presentan prevalencias del 85,4 y el 12%, respectivamente, pueden actuar como reservorios para las variantes de humanos (Stuenkel *et al.*, 2013), aunque algunos autores han puesto en duda su potencial zoonótico pues no se mantienen infectantes durante periodos prolongados (Silaghi *et al.*, 2012). En España se ha detectado en animales silvestres como corzos, con prevalencias entre el 15 y el 61% (de la Fuente *et al.*, 2008; García-Pérez *et al.*, 2016), ciervos (23,8%; Portillo *et al.*, 2011) y micromamíferos (0,8%; Barandika *et al.*, 2007). También, se han realizado estudios de seroprevalencia en animales domésticos detectándose en el 6% de las vacas y caballos y en aproximadamente el 1% de ovino y caprino procedente del norte de España (Amusatogui, Sainz y Tesouro, 2006); además, este patógeno se detectó en el 16,3% de las granjas de ovino de esa misma región (García-Pérez *et al.*, 2003).

1.2.1.4. Ciclo de vida

Anaplasma phagocytophilum es una de las pocas bacterias que sobrevive y se replica en el interior de los neutrófilos (Figura 1.19.). Cuando una garrapata se alimenta de la sangre de un hospedador cuyos neutrófilos están infectados por *A. phagocytophilum*, la bacteria se libera en el intestino de la garrapata e infecta las células intestinales, donde forma colonias. Posteriormente la bacteria se multiplica dentro de las células e infecta a otros tejidos e incluso a las glándulas salivales (Hajdusek *et al.*, 2013). El sialoma de las garrapatas estimula los neutrófilos asociados a la respuesta inflamatoria del hospedador durante el proceso de alimentación de la misma (Heinze *et al.*, 2012). La interacción de la bacteria con el sistema inmunitario del hospedador parece promover la infección y la transmisión del patógeno produciendo una gran cantidad de células infectadas tanto en la sangre circulante como en la zona de picadura (Chen *et al.*, 2012).

La translocación de la bacteria al interior de los neutrófilos del hospedador se produce mediante un proceso de endocitosis mediada por ligando; sin embargo, este receptor parece ser hospedador dependiente (Carlyon y Frikrig, 2003; Rikihisa, 2003). Tras la penetración, la bacteria se aloja en el interior de un endosoma citoplasmático, donde se multiplica mediante fisión binaria, dando lugar a unas agrupaciones denominadas mórulas. La salida de las bacterias al plasma se produce mediante lisis celular o por fusión de la membrana del endosoma con la membrana plasmática de la célula hospedadora (Sarkar *et al.*, 2012).

De manera experimental, Hodzic *et al.* (1998) comprobaron que la transmisión desde ratones infectados con *A. phagocytophilum* a *I. scapularis* tuvo lugar a las 24-48 horas después del inicio de la alimentación. Según Sukumaran *et al.* (2006), la bacteria migra desde el intestino hasta las glándulas salivales de la garrapata, pudiéndose encontrar en esa localización 24 horas después del comienzo de la alimentación.

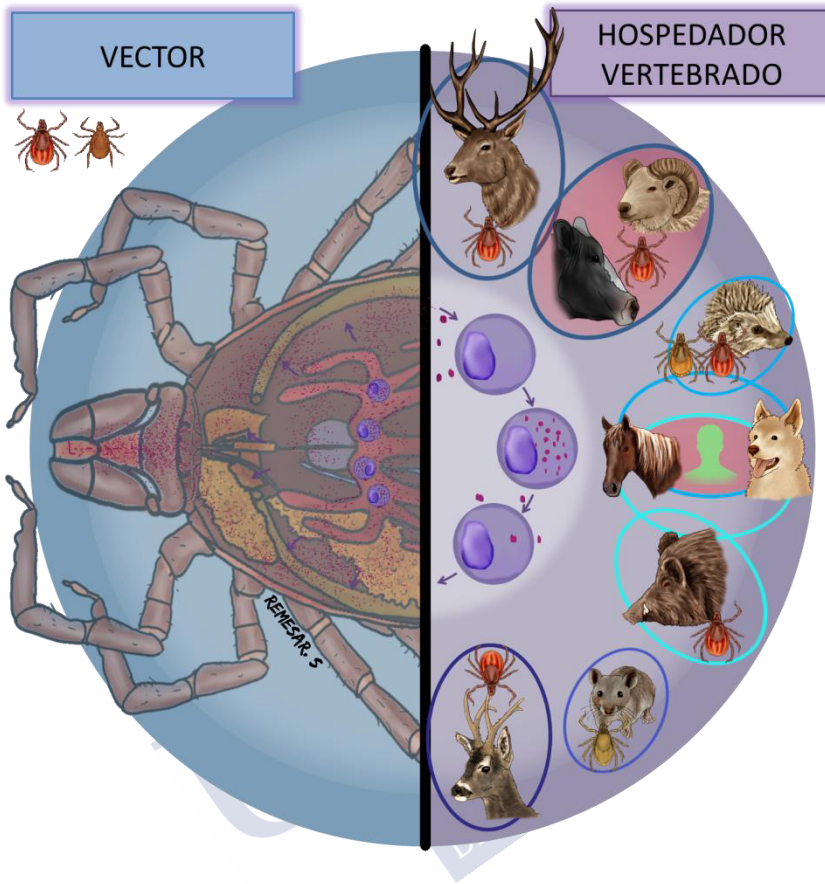


Figura 1.19. Ciclo de *Anaplasma phagocytophilum* en el que se representan los posibles ciclos entre la garrapata y sus hospedadores. Los diferentes círculos de colores representan un mismo ciclo cerrado entre la garrapata y el hospedador, mientras que los círculos superpuestos indican la posibilidad de ciclos relacionados. Aquellos hospedadores dentro de un círculo con relleno rojo podrían presentar sintomatología clínica

También se ha descrito la transmisión transplacentaria de *A. phagocytophilum* en vacas y ovejas (Henniger et al, 2013; Reppert et al., 2013); la transmisión a través de transfusiones sanguíneas (Annen et al., 2012; Townsend et al., 2014) y por contacto directo con sangre o secreciones respiratorias (Zhang et al., 2008).

1.2.1.5. Manifestaciones clínicas

En relación con las manifestaciones clínicas producidas tras la infección con *A. phagocytophilum*, se ha observado que los rumiantes domésticos suelen presentar fiebre, debilidad, anorexia, abortos e incluso pueden morir (Stuen *et al.*, 2013). También se ha relacionado con una reducción de la producción láctea, distrés respiratorio y edema de extremidades y se ha descrito que la bacteria puede producir un efecto inmunosupresor facilitando la aparición de infecciones secundarias (Woldehiwet, 2006; 2010). En los caballos ocasiona fiebre, debilidad, anorexia, ataxia, ictericia y edemas. Los perros y gatos pueden presentar fiebre, anorexia, letargia, debilidad, cojeras y en ocasiones hepato y esplenomegalia, aunque, en la mayoría de los casos no llegan a presentar manifestaciones clínicas (Carrade *et al.*, 2009; Sykes, 2014; Ruíz de Copegui-Fernández, 2016; Savidge *et al.*, 2016).

En las personas los síntomas son variables e inespecíficos, y frecuentemente compatibles con una gripe (fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular y malestar). En ocasiones pueden aparecer síntomas neurológicos (Ismail *et al.*, 2010) y, aunque el 60% de los pacientes solo presentan síntomas moderados, la anaplasmosis granulocítica humana puede ser letal (Dugat *et al.*, 2015). Al igual que en la enfermedad de Lyme, la anaplasmosis es estacional, puesto que la mayoría de los casos se registran durante el verano y finales de otoño, épocas del año en las que hay más ninfas y adultos de *Ixodes* spp. activos en la vegetación y las personas desarrollan una mayor actividad en la naturaleza (Strle, 2004).

1.2.2. Babesiosis y Theileriosis

Los organismos pertenecientes al género *Babesia* y *Theileria* son parásitos intraeritrocitarios transmitidos por garrapatas. Las especies de ambos géneros pertenecen al Phylum Apicomplexa, en el que también se incluyen otros patógenos humanos como *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Neospora*. Estos organismos son eucariotas y se caracterizan por poseer un complejo apical que les permite penetrar en

el interior de las células (Gordon y Sibley, 2005; Vannier y Krauser, 2009).

Se ha comprobado que existen numerosas especies de *Babesia* que tienen carácter zoonótico, como *Babesia microti*, *Babesia duncani*, *Babesia divergens* y *Babesia venatorum*, así como los complejos *Babesia microti-like*, *Babesia duncani-type* y *Babesia divergens-like* (Malandrin *et al.*, 2010; Vannier y Krause, 2012). Aunque las infecciones por *Babesia* son más frecuentes en animales silvestres, se considera una zoonosis emergente (Homer *et al.*, 2000). Por el contrario, las especies de *Theileria* no son zoonóticas e infectan exclusivamente a animales silvestres y domésticos, especialmente rumiantes (Homer *et al.*, 2000; Tampieri *et al.*, 2008; Zanet *et al.*, 2014).

1.2.2.1. Epidemiología

La babesiosis es una enfermedad de distribución mundial. Se han identificado más de 100 especies de *Babesia* que infectan a un elevado número de hospedadores vertebrados y, aunque la mayoría de reservorios son roedores y aves, cualquier animal puede actuar como un reservorio potencial (Homer *et al.*, 2000). Excepto *Babesia meri*, que se ha detectado en *Ornithodoros erraticus* (Gunders, 1977), la mayoría de las especies de *Babesia* se transmiten por garrapatas de la Familia Ixodidae.

Respecto a la babesiosis en las personas, como ocurre en otras enfermedades transmitidas por vectores, los datos epidemiológicos sugieren que se está produciendo una expansión geográfica y un incremento del número de casos; sin embargo, su incidencia es menor que la de la enfermedad de Lyme. Esto puede deberse a que su área geográfica es más restringida, al bajo ratio de infección de las garrapatas, al gran porcentaje de infección asintomática y a dificultades en su diagnóstico (Diuk-Wasser *et al.*, 2014). En América del Norte, *B. microti* es la especie más frecuente en personas, y se transmite fundamentalmente por *I. scapularis*; de hecho, en ninfas de esta especie de garrapata la prevalencia de *B. microti* oscila entre el

1% y el 20% en zonas endémicas. En otros continentes, como se indicó previamente, *B. microti* es común en roedores, pero es poco frecuente en infecciones humanas (Rozej-Bielicka *et al.*, 2015). En Europa la enfermedad producida por *B. divergens* no es muy frecuente afectando principalmente a individuos inmunodeprimidos o esplenotomizados (Gray *et al.*, 2010). La mayoría de los casos de babesiosis humana suceden en el verano en áreas donde el vector, los reservorios vertebrados y los cérvidos están próximos a los humanos (Krause *et al.*, 2003).

1.2.2.2. Vectores y hospedadores

En la Tabla 1.8., se resumen las principales especies de *Babesia* que afectan a los animales domésticos y a las personas en Europa; así como, el vector que las transmite (Uilenberg, 2006; Yabsley y Shock, 2012).

Babesia divergens es la especie más frecuente en Europa, siendo *I. ricinus* su principal vector; esta garrapata también puede transmitir *B. microti* y *B. venatorum* (Duh *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2010). *Babesia divergens* afecta principalmente a personas inmunodeprimidas o esplenectomizadas (Gray *et al.*, 2010) y la mayoría de los casos se declaran en verano (Krause *et al.*, 2003).

En Europa se han encontrado infecciones naturales por *B. microti* en una gran variedad de especies de roedores y musarañas, en los que circulan cepas tanto zoonóticas como no zoonóticas (Foppa *et al.*, 2002; Herwaldt *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2011). El vector principal de esta especie es *I. ricinus*, aunque en Inglaterra su vector principal es *I. trianguliceps*. En otros países europeos (Suiza, Polonia, Italia, República Checa, Estonia, Bélgica, Hungría, Alemania, Rusia, Países Bajos) y en EE.UU. se ha observado que *I. ricinus* puede albergar otras especies de *Babesia* similares a *B. microti* (Bown *et al.*, 2008).

Tabla 1.8. Principales hospedadores y vectores de las especies de *Babesia* detectadas en Europa

Especies	Hospedadores	Género del vector
<i>B. bigemina</i>	Búfalo, Bovinos	<i>Boophilus</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i>
<i>B. bovis</i>	Búfalo, Bovinos, Humanos	<i>Boophilus</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i>
<i>B. caballi</i>	Caballo, Burro, Mula, Cebra	<i>Dermacentor</i> , <i>Hyalomma</i>
<i>B. canis</i>	Perro, Gato?	<i>Dermacentor</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. divergens</i>	Bovinos, Humanos	<i>Ixodes</i>
<i>B. felis</i>	Gato	Desconocido
<i>B. gibsoni</i>	Perro	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. major</i>	Bovinos	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. microti complex</i> (<i>Babesia</i> sp. Munich)	Humanos, Roedores	<i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. motasi</i>	Ovejas, Cabras	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. ovis</i>	Ovejas, Cabras	<i>Rhipicephalus</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Ixodes</i>
<i>B. perroncitoi</i>	Cerdo	Desconocido
<i>B. trautmanni</i>	Cerdo	<i>Rhipicephalus</i>
<i>B. venatorum</i>	Humanos, cérvidos	<i>Ixodes</i>
<i>B. vogeli</i>	Perro	<i>Rhipicephalus</i>

Respecto al grupo *B. microti*-like, se ha señalado que se transmiten mediante *I. hexagonus* (Miró *et al.*, 2015). Estas garrapatas son endófilas y parasitan principalmente a erizos y carnívoros silvestres, siendo frecuentes en perros de cazadores (Harris y Thompson, 1978). El grupo *B. microti*-like también se ha aislado en *I. ricinus* e *Ixodes canisuga*, aunque se desconoce su potencial como vectores (Najm *et al.*, 2014).

Otra especie de *Babesia* considerada zoonótica, especialmente en Europa, es *B. venatorum* (Herwaldt *et al.*, 2003), cuyo vector principal es también *Ixodes ricinus* (Malandrin *et al.*, 2010). Se ha aislado en

muestras procedentes de ungulados silvestres como corzos (Duh *et al.*, 2005; Tampieri *et al.*, 2008; Zanet *et al.*, 2014) y muflones (Kauffman *et al.*, 2016).

Babesia canis se ha diagnosticado en toda Europa y es el principal agente causal de la babesiosis canina, presentando una prevalencia media del 1 al 16% (Halos *et al.*, 2013). El principal vector de *B. canis* es *D. reticulatus* (Petney *et al.*, 2012). En cánidos también se han aislado *B. microti* y *Babesia vogeli* (Camacho *et al.*, 2001; Simoes *et al.*, 2011; Rene *et al.*, 2012; Gabrielli *et al.*, 2015), aunque su prevalencia es más baja que la de *B. canis* (Beck *et al.*, 2009). *Babesia gibsoni* también puede causar babesiosis canina siendo *R. sanguineus* su vector principal (Zahler *et al.*, 1998; Zahler *et al.*, 2000; Iwakami *et al.*, 2014).

Las especies de *Theileria* se transmiten por garrapatas de diferentes géneros, principalmente *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* (Tabla 1.9.). Aunque estos apicomplexa pueden parasitar a diversas especies de hospedadores, afectan fundamentalmente a los rumiantes (Mehlhorn y Schein, 1998; Giangaspero *et al.*, 2015; Bilgic *et al.*, 2017).

Tabla 1.9. Principales hospedadores y vectores de las especies de *Theileria* detectadas en Europa

Especies	Hospedadores	Género del vector
<i>T. annulata</i>	Bovinos, búfalo asiático	<i>Hyalomma</i>
<i>T. equi</i>	Caballos	<i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Amblyomma</i> , <i>Hyalomma</i>
<i>T. lestoquardi</i>	Ovejas y cabras	<i>Hyalomma</i>
<i>T. orientalis</i>	Bovinos, búfalo americano	<i>Haemaphysalis</i>
<i>T. ovis</i>	Ovejas y cabras	<i>Rhipicephalus</i>
<i>T. sp. OT3</i>	Corzo, ciervo, oveja, rebeco	-
<i>T. sp. 3185/02</i>	Corzo, ciervo	<i>Ixodes</i>

1.2.2.3. Ciclo de vida

Los ciclos vitales de *Babesia* spp. y *Theileria* spp. son similares ya que ambos parásitos presentan un estadio haploide con replicación asexual en el hospedador animal y un ciclo sexual diploide en el

vector. No obstante, *Babesia* solo se desarrolla en los eritrocitos mientras que *Theileria* lo hace en éstos y en los leucocitos, siendo su patogenicidad dependiente de la capacidad de multiplicación durante su fase intraleucocitaria (Mans *et al.*, 2015).

El ciclo biológico de *Babesia* spp. se representa en la Figura 1.20. Cuando una garrapata no infectada por este protozoo se alimenta de un hospedador infectado, los merozoítos que se encontraban en el interior de los eritrocitos, se liberan y se forman gametos masculinos y femeninos. Tras la fase de gametogonia se forma el cigoto que se diferencia en el interior de las células intestinales de la garrapata y da lugar a un quineto móvil (ooquineto) que es capaz de atravesar la pared intestinal y diseminarse por la hemolinfa y los diferentes órganos, incluido los ovarios y las glándulas salivales, lo que permite que el parásito se pueda transmitir tanto de forma transestadial como transovárica. Este último tipo de transmisión en el vector se ha podido demostrar en algunas especies como *B. venatorum* (Bonnet *et al.*, 2007). Posteriormente, las formas parasitarias se reproducen asexualmente dando lugar a esporoquinetos (Antunes *et al.*, 2017).

Cuando la garrapata se vuelve a alimentar, se produce una última esporogonia y los quinetos que invadieron las glándulas salivales dan lugar a múltiples esporozoítos que se mezclan con las secreciones de las glándulas salivales (Hajdušek, 2013). De esta forma los esporozoítos se transmiten al nuevo hospedador y, en el interior de los eritrocitos, maduran a trofozoítos, que se reproducen por división asexual y originan dos o cuatro células hijas denominadas merozoítos; éstos invaden rápidamente otros eritrocitos originando su lisis.

Para que se produzca la transmisión de *Babesia* spp. es necesario que la garrapata se alimente del hospedador durante una media de 36-72 horas (Piesman y Spielman, 1980). Así mismo, Herwaldt *et al.* (2011) han señalado que la babesiosis también puede adquirirse mediante transfusión sanguínea y transmisión transplacentaria.

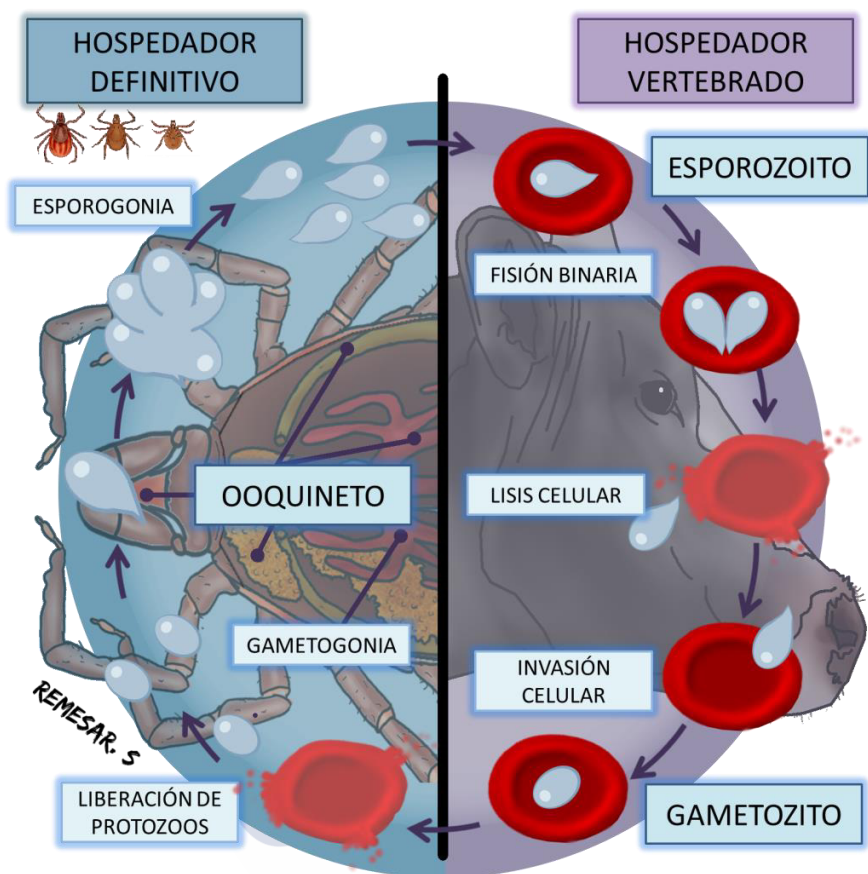


Figura 1.20. Ciclo biológico de *Babesia* spp.

El ciclo de *Theileria* spp. (Figura 1.21.) se caracteriza porque las garrapatas infectadas con este parásito depositan los esporozoítos en el punto de alimentación desde donde invaden a los leucocitos donde, durante varios días, se replican asexualmente por esquizogonia originando esquizontes multinucleares. Estos esquizontes experimentan varios grados de multiplicación antes de diferenciarse para producir merozoítos. Durante la fase intraleucocitaria el parásito puede causar la activación y proliferación de los leucocitos infectados y asociarse al huso mitótico durante la división celular, siendo capaz de dividirse al mismo tiempo que las células infectadas, haciendo así que las células hijas también se infecten (Morrison, 2015).

Posteriormente los merozoítos se liberan de las células infectadas e invaden los eritrocitos iniciando así la fase intraeritrocitaria, infectante para las garrapatas; en esta fase el parásito, incluso en las especies más patógenas, presenta escasa o nula multiplicación (merogonia) siendo la fase intraleucocitaria la responsable de los elevados niveles de piroplasmas durante la fase aguda de la infección.

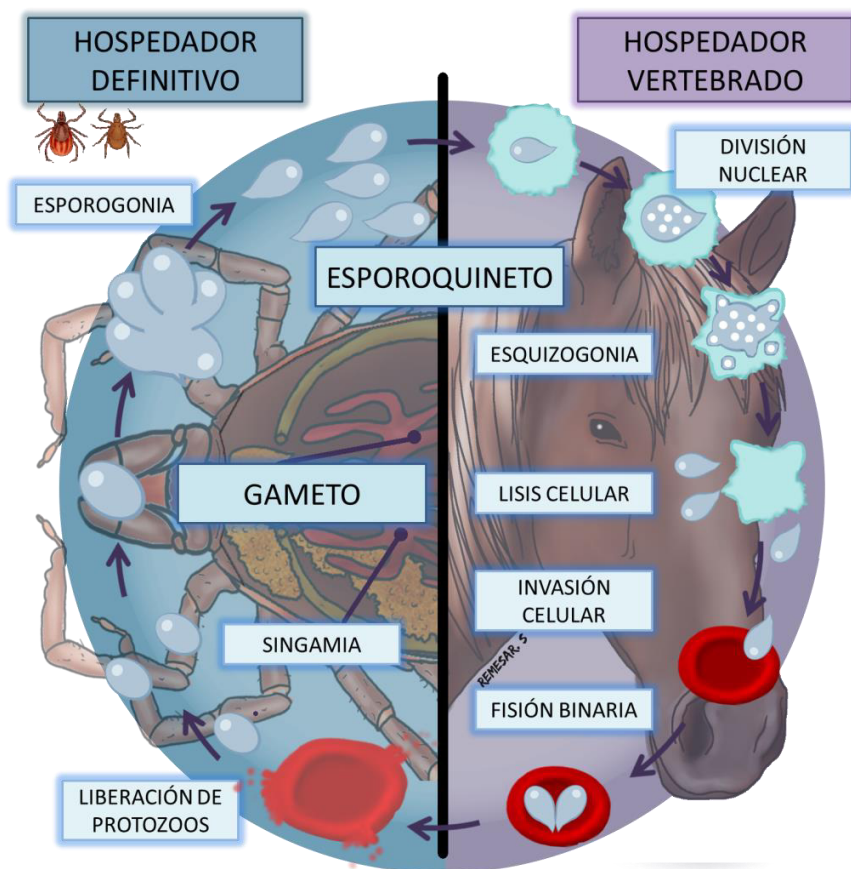


Figura 1.21. Ciclo biológico de *Theileria* spp.

Cuando el vector se alimenta de los eritrocitos infectados, se produce una fase de reproducción sexual en el intestino de la garrapata (gametogonia). El cigoto, al igual que ocurre en *Babesia*, se forma a partir de la unión de dos gametos que son micro y macroscópicamente

similares. Este cigoto es capaz de invadir las células epiteliales del intestino de la garrapata y diferenciarse en un cigoto móvil que se dirige hacia las glándulas salivales, pero no hacia los ovarios, dónde realiza varias replicaciones asexuales (esporogonia) dando lugar a esporozoítos; este proceso se estimula durante el periodo de alimentación.

1.2.2.4. Manifestaciones clínicas

En personas la babesiosis cursa con una sintomatología inespecífica. Al cabo de 1 a 4 días después de la picadura de la garrapata, o de 1 a 9 semanas tras la transfusión de sangre infectada con *Babesia* spp., se observan síntomas similares a los producidos por una infección leve. Durante este periodo el paciente puede presentar fiebre, malestar, fatiga e incluso temblores, sudores, dolor de cabeza, náuseas, etc. (Joseph *et al.*, 2011). No obstante, también puede observarse distrés respiratorio, edema pulmonar, coagulación intravascular diseminada, fallo cardíaco congestivo, fallo renal, coma y muerte (White, *et al.*, 1998; Joseph, *et al.*, 2011).

En perros los principales agentes causales en Europa son *B. canis* y *B. gibsoni*, aunque la sintomatología de la babesiosis depende del agente causal, lo más frecuente es que los animales infectados muestren anorexia, debilidad, fiebre y pérdida de peso. En ocasiones la infección puede cursar de manera aguda produciendo anemia hemolítica, ictericia, esplenomegalia y linfadenopatía (Sykes, 2014). Las principales especies de *Babesia* que afectan al ganado vacuno son *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*, estos animales presentan anorexia, fiebre y palidez de mucosas y en poco tiempo acaban desarrollando anemia; si la enfermedad se manifiesta de manera subaguda pueden presentar insuficiencia respiratoria; según la especie de *Babesia* implicada la enfermedad puede cursar con abortos y alteraciones en el sistema nervioso central (Bock *et al.*, 2004). Los caballos con piroplasmosis presentan debilidad, anemia, ictericia y fiebre, aunque los signos clínicos son variables, al igual que en vacuno, pueden presentar abortos (Zobba *et al.*, 2008).

Los animales con theileriosis presentan una sintomatología menos acusada que la de la babesiosis caracterizada por cursar con fiebre, letargia, petequias, edemas e ictericia (Wise *et al.*, 2014).

1.2.3. Borreliosis

Este término incluye todas las enfermedades producidas por espiroquetas del género *Borrelia*, muchas de las cuales son zoonóticas como las causantes de la fiebre recurrente transmitida por garrapatas y de la enfermedad de Lyme (EL) o borreliosis de Lyme. Esta última es la infección transmitida por garrapatas más común en EE.UU., Asia y Europa.

Las especies pertenecientes al género *Borrelia* son bacterias Gram-negativas del Phylum Spirochaetae que se caracterizan por su morfología helicoidal y por no presentar lipopolisacáridos en la membrana externa, poseer un flagelo periplásmico y ADN lineal.

Estas bacterias pueden agruparse en dos grupos filogenéticos mayores, uno engloba los agentes causales de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), y el otro aquellas espiroquetas responsables de la fiebre recurrente (*Borrelia miyamotoi*). No obstante, también existen otras especies de *Borrelia* que se consideran apatógenas y un grupo asociado a reptiles (Franke *et al.*, 2013).

1.2.3.1. Epidemiología

En el grupo *B. burgdorferi* s.l. se incluyen espiroquetas que pueden actuar como agentes causales de la EL. Esta enfermedad se identificó por primera vez hace aproximadamente 30 años y se considera una de las infecciones zoonóticas más importantes en el hemisferio norte. Aunque anualmente se denuncian decenas de miles de casos clínicos, se estima que el número de casos no declarados es diez veces superior (Kampen *et al.*, 2004; Mead, 2015). Además, según Kilpatrick *et al.* (2017), en los últimos 20 años el número de casos clínicos ha aumentado, probablemente debido, entre otras causas, al cambio climático, cambios en la estructura de la vegetación y de la cobertura forestal, la diferente utilización de las tierras

cultivables, las fragmentaciones del hábitat y a las variaciones en las comunidades de hospedadores (Kurtenbach *et al.*, 2005; Estrada-Peña *et al.*, 2011; Medlock *et al.*, 2015; Nelson, *et al.*, 2015).

A pesar de que la EL no es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países, parece que es más frecuente en el Norte y en Centro Europa, donde su incidencia puede oscilar entre 20 a 100 casos por cada 100.000 habitantes (datos obtenidos de la EUCALB y EpiNorth). Por su parte, la incidencia es menor en países del sur de Europa como España, Francia, Italia y Grecia, así como en el Reino Unido (Jaenson y Lindgren, 2011). En la Tabla 1.10. se señala la incidencia de la EL en diferentes países según los datos señalados por Mead (2015).

Esta enfermedad se diagnostica con mayor frecuencia durante los meses más cálidos (Vázquez-López *et al.*, 2015; Vázquez-López *et al.*, 2016 a, b). En España, la incidencia media es de 0,25 por cada 100.000 habitantes, existiendo grandes variaciones entre las diferentes zonas. De este modo, en un artículo publicado en el 2016 (Bonet-Alavés *et al.*, 2016), se estableció que la incidencia por cada 100.000 habitantes era de entre el 0,08 y el 2,96 para el norte de España; entre el 0 y el 0,24 en el centro y de entre el 0 y el 1,09 en el sur encontrándose las incidencias más elevadas en la provincia de Lugo (Galicia) con una media de 2,96 casos por cada 100.000 habitantes, sin embargo al no tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria es muy probable que su incidencia se esté infraestimando.

Las ninfas son el estadio que tiene una mayor importancia en la transmisión de la enfermedad a las personas (Mead, 2015). Es importante tener en cuenta que el tiempo de incubación de la enfermedad es variable, existiendo un retraso de 2 meses desde la picadura de la garrapata hasta el diagnóstico (Vázquez-López *et al.*, 2015; Vázquez-López *et al.*, 2016 a, b). En la mayoría de casos diagnosticados el *erythema migrans* (EM) es la principal manifestación frente a otras como las alteraciones neurológicas, cardíacas o la artritis (Mead, 2015).

Tabla 1.10. Incidencia de la Enfermedad de Lyme en diversos países

País/Región	Casos/ 100.000 habitantes	Año/s
Alemania	36,5	2006
Austria	135,0*	2005
Bélgica	16,0	2005
Bielorrusia	10,8	2013
Bulgaria	13,0	2005
Canadá	<0,1	1995-2006
Croacia	5,9	1993-2000
Dinamarca	1,2	2012
Escocia	1,7	2002-2005
Eslovaquia	19,2	2008
Eslovenia	206,0	2005
España	3-5	n/a
EE.UU.	8,6	2013
Estonia	84,5	2013
Finlandia	29,4	2013
Francia	42,0	2009-2012
Hungría	12,8	2001-2005
Inglaterra y Gales	1,7	2008-2009
Irlanda	0,6	1995
Islandia	7,0	2011
Italia	<0,1	2001-2005
Japón	<0,1	2000-2005
Letonia	22,4	2013
Lituania	86,8	2013
Moldavia	0,7	2003-2005
Noruega	5,1	2012
Países Bajos	103,0*	2005
Polonia	22,8	2012
Portugal	0,1	1999-2004
República Checa	36,0	2005
Rusia	3,4-28	1999-2006
Serbia y Montenegro	2,4	1988-1994
Suecia	69,0	1992
Suiza	25,1	1988-1998
Turquía	<0,1	1990-2002
Ucrania	3,6	2012

*Valor estimado

Además se ha determinado que la infección con ciertas genoespecies del grupo *B. burgdorferi* s.l. puede originar signos

clínicos en perros y gatos (Littman *et al.*, 2018). En varios estudios realizados en España se detectaron seroprevalencia en perros de entre el 0 y el 11,6%, dependiendo de la zona de estudio (Solano-Gallego *et al.*, 2006; Musategui *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 2016). Así mismo, estos autores (Merino *et al.*, 2016) determinaron la existencia de una mayor seroprevalencia en perros de caza y pastores. En un estudio realizado en gatos procedentes de Cataluña, solamente uno de los animales resultó positivo (0,86%; Ravicini *et al.*, 2016).

En un artículo de revisión (Hubálek y Halouzka, 1997) de 1.263 aislados de *B. burgdorferi* s.l. procedentes de 26 países europeos el 39,7%, 37,1%, 15,9%, 6,7% y el 0,6% se identificaron como *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia valaisiana* y *Borrelia lusitaniae*, respectivamente. Sin embargo y según diversos autores (Etti *et al.*, 2003; Hanincová *et al.*, 2003; Taragel'ová, 2005) parece que la distribución de las genoespecies de *Borrelia* puede variar a lo largo del tiempo y de la zona.

Así, *B. afzelii* es más frecuente en el norte y en el este (Rauter y Hartung, 2005); *B. garinii* en el oeste y *B. lusitaniae* es más prevalente en Portugal y en el norte de Marruecos, Argelia y Túnez (Maraspin *et al.*, 2006). Recientemente, Mead (2015) señaló que, en Europa, la principales genoespecies detectadas en pacientes con enfermedad de Lyme son *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. burgdorferi* s.s. y en menor proporción *B. lusitaniae*, *Borrelia spiemanii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia valaisiana* y *Borrelia spielmanii*.

Aunque *B. miyamotoi* se aisló por primera vez hace casi 20 años, su potencial zoonótico no se conoció hasta el 2011 y todavía se desconoce la incidencia real de la enfermedad (Wagemakers *et al.*, 2015). En zonas endémicas de EE.UU. su prevalencia oscila entre el 1 y el 3,9% (Krause *et al.*, 2015).

1.2.3.2. Vectores

Los principales vectores de la EL son garrapatas del género *Ixodes* (Tälleklint y Jaenson, 1996; Gern y Humair, 2002; Mead, 2015), especialmente *I. pacificus* e *I. scapularis* en el oeste y este de América del Norte, respectivamente, *I. persulcatus* en Eurasia e *I. ricinus* en Europa. Además, en *I. ricinus* se han detectado infecciones mixtas por dos o tres especies diferentes de *Borrelia*, siendo *B. garinii* y *B. valaisiana* la coinfección más frecuente, seguida de *B. garinii* y *B. afzelii*, aunque estas coinfecciones son menos frecuentes que las simples (Movila *et al.*, 2012).

La mayoría de las garrapatas Ixodidae transmiten *B. burgdorferi* s.l. de manera transestadial, mientras que la transmisión transovárica de la mayoría de genopecies se considera poco probable. Aunque de forma ocasional se han detectado larvas de *Ixodes* spp. positivas a esta bacteria en la naturaleza, no se consideraba que la transmisión transovárica fuera un hecho epidemiológicamente importante en la mayoría de las genospecies pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* s.l. (Tilly *et al.*, 2008; Kjelland *et al.*, 2011; Tappe *et al.*, 2014). Sin embargo, un estudio reciente ha comprobado que larvas de *I. ricinus* infectadas con *B. afzelii* son capaces de transmitir esta espiroqueta a roedores que, a su vez, pueden transmitir esta bacteria a otras garrapatas (van Duijvendijk *et al.*, 2016); estos resultados sugieren que la transmisión transovárica es posible, como ya se había demostrado para *B. miyamotoi* (Rollend *et al.*, 2013).

Así mismo, se ha comprobado que otros géneros de garrapatas pueden infectarse con *B. burgdorferi*, concretamente ciertas especies de *Amblyomma* y *Dermacentor*, que, al igual que *Ixodes cookie*, *Ixodes holocyclus* e *I. ovatus*, pueden adquirir esta bacteria después de alimentarse de un hospedador infectado. Sin embargo en estas especies de ixódidos no se ha demostrado la transmisión transestadial, o ésta es muy rara, por lo que no existen evidencias de que sean capaces de transmitir la EL (Johns *et al.*, 2001; Eisen y Lane, 2002).

Borrelia miyamotoi también se transmite por garrapatas de la familia Ixodidae (Krause *et al.*, 2015). Esta especie de *Borrelia* se aisló por primera vez en *I. persulcatus* en Asia y Europa y desde su primer aislamiento se ha encontrado en otras especies de garrapatas como *I. ricinus* en Europa; *I. scapularis* en el noreste y norte de EE.UU. y Canadá; *I. ovatus* e *Ixodes pavlovsky* en el norte de Asia e *I. pacificus* en el oeste de EE.UU. (Estrada-Peña y Jongenjan, 1999; Gil *et al.*, 2005).

Respecto a la prevalencia de infección por *B. miyamotoi* en las garrapatas, se ha señalado que la infección es más prevalente en *I. persulcatus* (3,6%) que en *I. scapularis* (2,0%) o *I. ricinus* (1,3%) (Scoles *et al.*, 2001; Barbour *et al.*, 2009; Platonov *et al.*, 2011; Hansford *et al.*, 2015). Además, estos mismos autores han comprobado que la prevalencia era más elevada en ninfas (1,8%) y adultos (1,2%) que en las larvas (0,5%). Aunque la prevalencia existente en larvas es baja, se ha demostrado que tanto las larvas de *I. scapularis* como las de *I. ricinus* pueden actuar como vectores del patógeno (van Duijvendijk *et al.*, 2016; Breuner *et al.*, 2018).

1.2.3.3. Hospedadores

En relación con los hospedadores o reservorios de la EL en las áreas endémicas, se ha comprobado que la presencia de *Borrelia* spp. depende de la existencia de reservorios animales que, generalmente, no desarrollan manifestaciones clínicas (Gern *et al.*, 2009). Actualmente se sabe que los potenciales hospedadores de las garrapatas son numerosos e incluyen a diferentes especies animales como pequeños y grandes mamíferos, pájaros y reptiles. Sin embargo, estos hospedadores pueden actuar de manera diferente, pudiendo actuar en algunos casos un simple recurso alimentario para los vectores o como reservorios del patógeno (Grubhoffer *et al.*, 2005; Gern *et al.*, 2009; Pisanu *et al.*, 2014; Ruyts *et al.*, 2017).

El grado de infección de un hospedador se puede estimar como la fracción de larvas no infectadas que adquieren la infección tras su alimentación sobre este hospedador y este grado de infección es

distinto para los diferentes hospedadores y las diferentes genoespecies de *Borrelia* (Gern *et al.*, 1998). De este modo la dinámica de transmisión de *B. burgdorferi* s.l. está influenciada por la existencia de especies de hospedadores que presentan diferentes patrones de infestación por garrapatas y cuya competencia como reservorio varía de unos a otros (Gray *et al.*, 1998; Mannelli *et al.*, 2012); así el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) se considera el principal reservorio de *B. burgdorferi* s.s. en EE.UU., mientras que en Europa los roedores y las aves migratorias parecen ser los principales reservorios de *B. afzelii* y *B. garinii*, respectivamente. Así mismo, *B. valaisiana* se asocia con aves (Humair *et al.*, 1998), *B. bavariensis* con ratones (Huegli *et al.*, 2002) y *B. spielmanii* con lirones (Richter y Matuschka, 2006). Aunque *B. lusitaniae* está asociada a reptiles (Dsouli *et al.*, 2006), también se ha aislado en pájaros y ratones (Poupon *et al.*, 2006; de Carvalho *et al.*, 2010).

No obstante, no todos los hospedadores son competentes como reservorios de la EL, ya que algunos son capaces de destruir total o parcialmente las borrelias; por ejemplo, diversos autores sostienen que el sistema del complemento de los cérvidos presenta efecto borrelicida ya que puede destruir diversas genoespecies de *Borrelia* (Matuschka *et al.*, 1993; Kurtenbach *et al.*, 2001 y 2002; Bhide, 2005). Sin embargo, el visón europeo, los perros, gatos, lobos y lince presentan un efecto borrelicida intermedio, ya que destruyen la mayoría de las borrelias (Kurtenbach *et al.*, 2001 y 2002; Bhide, 2005), mientras que las ovejas y los muflones, aunque también poseen una cierta capacidad borrelicida, se consideran reservorios de esta espiroqueta (Nagore *et al.*, 2004). Además, se ha sugerido que los animales antes citados, aunque no sean hospedadores competentes, son capaces de infectar a las garrapatas que se alimentan de ellos mediante un mecanismo de coalimentación (Pichon *et al.*, 2000; Kjelland *et al.*, 2011; Rizzoli *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2011; Sprong *et al.*, 2012).

En la Tabla 1.11. se resumen las principales genoespecies de *Borrelia* que pueden actuar de hospedador o de reservorio (*), así

como, el vector que las transmite (Steere *et al.*, 2004; Movila *et al.*, 2006).

Tabla 1.11. Principales hospedadores y vectores de las diversas genoespecies de *Borrelia* relacionadas con la enfermedad de Lyme

Genoespecies	Distribución	Hospedadores/ Reservorio*	Vector
<i>B. afzelii</i>	Europa Asia	Roedores*	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>
<i>B. americana</i>	EE.UU.	Pájaros	<i>I. pacificus</i> <i>I. minor</i>
<i>B. andersoni</i>	EE.UU.	Conejo de cola de algodón	<i>I. dentatus</i>
<i>B. bavariensis</i>	Europa Asia	Roedores*	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>
<i>B. bissettii</i>	Europa EE.UU.	Roedores	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Europa EE.UU.	Roedores*, pájaros*, lagartos, grandes animales	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>
<i>B. garinii</i>	Europa Asia	Roedores*, pájaros*, lagartos	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. hexagonus</i> <i>I. trianguliceps</i>
<i>B. lusitaniae</i>	Europa Norte de África	Pájaros, lagartos	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Roedores	<i>I. ricinus</i>
<i>B. valaisiana</i>	Europa Asia	Pájaros, lagartos	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>

Borrelia miyamotoi se ha aislado en muestras de sangre de ratones (*Peromyscus leucopus*, *Apodemus argenteus* y *Apodemus speciosus*), topillos (*Myodes glareolus*, *Myodes rufocanus*, *Myodes rutilus*) y pavos (*Meleagris gallopavo*) (Hamšíková *et al.*, 2017). También se detectó ADN de este patógeno en garrapatas procedentes de jabalí (*Sus scrofa*), corzo (*Capreolus capreolus*) y mirlo (*Turdus merula*) (Wodecka *et al.*, 2014) aunque es difícil establecer si esos animales fueron la causa de la infección. Por todo ello, en general se considera

que *B. miyamotoi* es más frecuente en pequeños roedores mientras que su presencia es esporádica en aves y animales de mayor tamaño (Wodecka *et al.*, 2014).

1.2.3.4. Ciclo de vida

El ciclo de las principales genopecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. en relación con *I. ricinus*, su principal vector, y sus reservorios se resume en la Figura 1.22. Las espiroquetas causantes de la EL raramente se transmiten antes de que transcurran 24 horas de la fijación de la garrapata a su hospedador ya que, después de la picadura, las borrelias que se encuentran en el intestino de las garrapatas tienen que migrar hasta las glándulas salivales para poder ser vehiculadas con la saliva. La principal ruta de transmisión de *B. burgdorferi* s.l. de los reservorios a las garrapatas se relaciona con una infección sistémica de los vertebrados seguida por una infección de larga duración en las garrapatas. Las ninfas presentan un rango de hospedadores similares a las larvas, manteniendo de este modo, en el caso de encontrarse infectadas, una población de hospedadores infectados para la siguiente generación de garrapatas. Si hay un gran número de ninfas infectadas en primavera, aumentará la probabilidad de que los animales de menor tamaño se infecten; todo ello facilitará que durante el verano del mismo año las larvas se infecten al alimentarse de estos animales (Mannelli *et al.*, 2012). Por el contrario, se considera que las garrapatas adultas no tienen un papel importante en el mantenimiento de la infección en la naturaleza, ya que se alimentan principalmente de animales de gran tamaño como ciervos, que no son hospedadores competentes de *Borrelia* (Radolf *et al.*, 2012).

También se ha comprobado que *Borrelia* puede transmitirse durante la cópula de los vectores; de este modo una hembra podría infectarse con la bacteria por contacto con un macho infectado, lo que depende de los niveles de espiroquetas presentes en las gónadas de las garrapatas. De hecho, se ha demostrado que *B. garinii* puede transmitirse durante la cópula de los machos con las hembras de *I.*

persulcatus (Alekseev, 1999), lo que podría explicar la predominancia de esta geno especie en esta especie de garrapata. Además, también se supone que esta transmisión es unidireccional, siendo posible la transmisión desde los machos a las hembras, pero no a la inversa (Alekseev, 1999). Sin embargo, esta transmisión parece no presentarse en otras geno especies como *B. afzelii*.

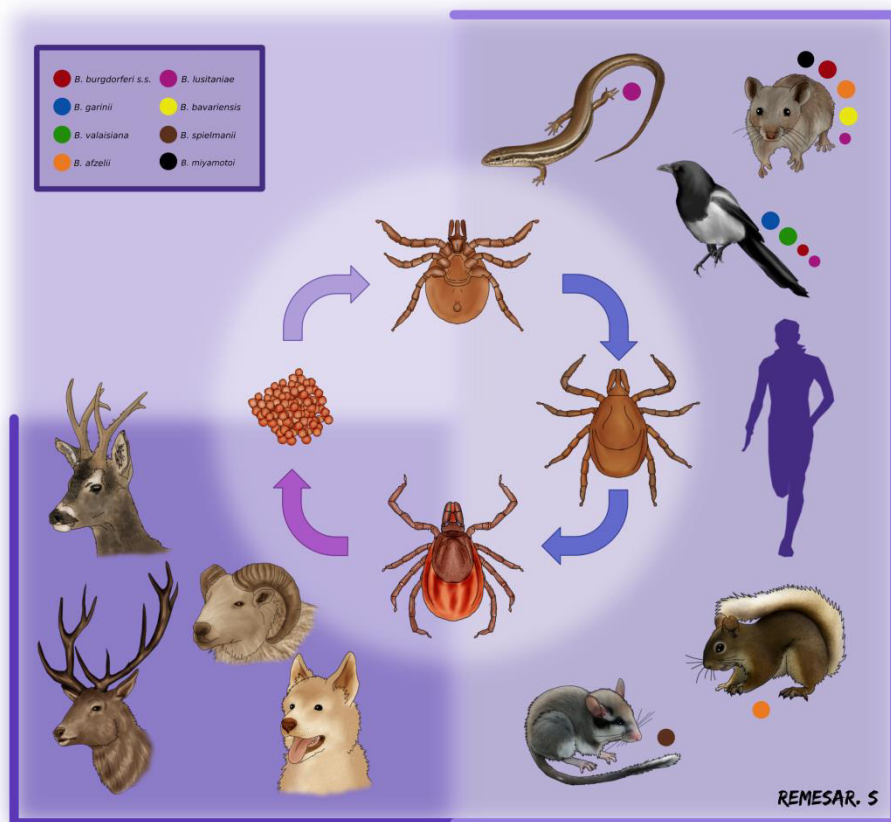


Figura 1.22. Ciclo de las genopecies de *Borrelia* transmitido por *I. ricinus* y sus principales reservorios

Respecto al ciclo de *B. miyamotoi*, no se conoce con exactitud si este patógeno permanece en el intestino de las garrapatas o ya está presente en las glándulas salivales, ni tampoco se ha determinado la rapidez de la transmisión tras la picadura (Wagemakers *et al.*, 2015).

La fiebre recurrente causada por *B. miyamotoi*, *B. recurrentis* y *B. duttonii* también se puede transmitir a través de transfusiones de sangre de personas infectadas (Krause *et al.*, 2015)

1.2.3.5. Manifestaciones clínicas

En personas, la enfermedad de Lyme presenta manifestaciones clínicas diferentes en cada estadio con periodos de remisión y exacerbación (Steere, 2004).

-Infección localizada: se produce entre los 3 y 30 días después de la picadura de la garrapata. En la zona de fijación aparece una lesión denominada “*erythema migrans*” (EM) que se extiende gradualmente alcanzando unos 5 cm de diámetro y se caracteriza por la presencia de un halo eritematoso con un área de palidez central. Es importante tener en cuenta que, en zonas endémicas de Europa, entre el 0,3 y el 5,2% de las picaduras de garrapatas se produce el EM y, en los casos en los que no hay EM, la seroconversión oscila entre el 3,5 y el 8,2%. No obstante, en esta fase, la mayoría de los síntomas son inespecíficos.

-Infección diseminada: se observa varios días o semanas después de la picadura de la garrapata, debido a que hay una amplia diseminación de la bacteria por la circulación sanguínea y el fluido cerebroespinal. Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen lesiones cutáneas secundarias en forma anular, meningitis linfocitaria, neuropatía craneal, radiculoneuritis, bloqueo en el nodo atrioventricular, dolor musculoesquelético en articulaciones, bursa, tendón, músculos o hueso y en ocasiones manifestaciones oculares (Vázquez-López *et al.*, 2015).

-Infección persistente: se produce semanas o meses después de la infección diseminada, debido a que *Borrelia* spp. pueden sobrevivir en nichos localizados durante varios años encontrándose principalmente en las articulaciones, sistema nervioso y piel.

Aunque las tres genopecies mayoritarias en Europa pueden causar alteraciones cutáneas, neurológicas y reumatológicas parece

que *B. garinii* es la genoespecie más frecuentemente aislada en pacientes con neuroborreliosis; el EM y la acrodermatitis son frecuentemente hallazgos en pacientes infectados con *B. afzelii*, mientras que la artritis es la manifestación más importante en los infectados con *B. burgdorferi* s.s. (Ornstein *et al.*, 2001; Steere *et al.*, 2004; Vázquez-López *et al.*, 2015; Vázquez-López *et al.*, 2016b).

Aunque en los perros suele cursar de manera asintomática, pueden presentar fiebre, inapetencia, trombocitopenia y dolor articular, incluso se ha descrito la aparición de glomerulonefritis (Sykes, 2014; Ruíz de Copegui-Fernández, 2016).

En relación con la sintomatología de *B. miyamotoi*, la mayoría de los pacientes muestran un cuadro febril inespecífico aproximadamente a las dos semanas de la picadura de la garrapata. Además, en el 98% de los casos presentan fiebre, fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular, escalofríos y náuseas. En general estos síntomas desaparecen una semana después del comienzo de la terapia antibiótica (Krause *et al.*, 2015).

1.2.4. Rickettsiosis

Rickettsia es un género de bacterias Gram-negativas intracelulares obligadas incluidas en la Familia Rickettsiaceae. Este género se ha dividido, en función de diferencias epidemiológicas, antigénicas y clínicas, en dos grupos (Tabla 1.12.): el grupo tifus epidémico (GT) y el grupo de las fiebres manchadas (GFM) (Parola *et al.*, 2013; Merhej *et al.*, 2014; Katargina *et al.*, 2015). Para algunos autores, existe además un tercer grupo denominado “ancestral”, al que pertenecen *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, que sería filogenéticamente anterior a la división del género en los grupos GFM y GT (Stothard *et al.*, 1994).

Aunque existen otras especies de *Rickettsia* y *Candidatus Rickettsia* depositadas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), muchas de ellas no se han caracterizado todavía, por lo que carecen de descripción.

Tabla 1.12. Clasificación en grupos de las especies de *Rickettsia* según el análisis filogenético de los genes 16S ARNr, *gltA*, *ompA* y *ompB*

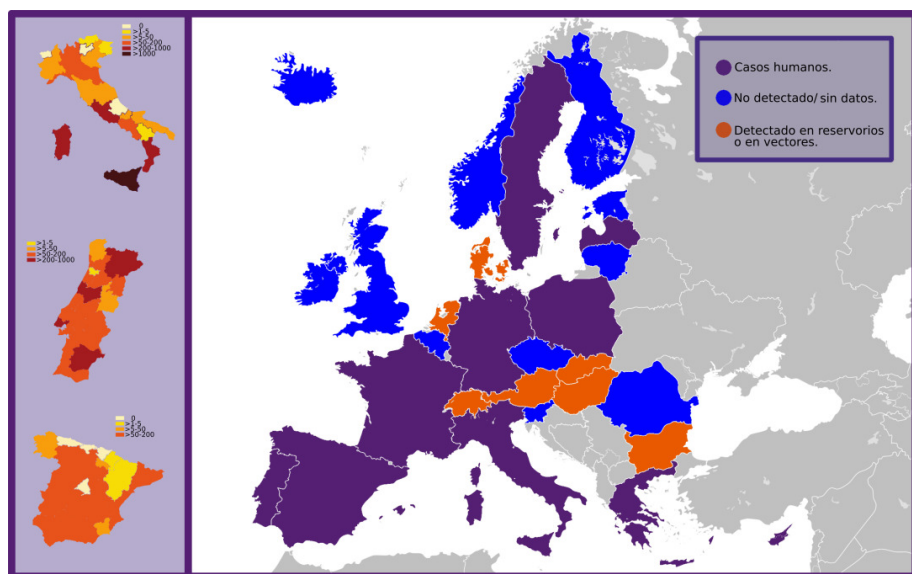
Grupo de las fiebres manchadas (GFM)	Grupo <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>R. africae</i>
		<i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i>
		<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>
		<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>
		<i>R. heilongjiangensis</i>
		<i>R. honei</i>
		<i>R. japonica</i>
		<i>R. parkeri</i>
		<i>R. peacockii</i>
		<i>R. rickettsii</i>
		<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>
		<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>
		<i>R. slovaca</i>
Grupo de las fiebres manchadas (GFM)	Grupo <i>Rickettsia massiliae</i>	<i>R. aeschlimannii</i>
		<i>R. massiliae</i>
		<i>R. montanensis</i>
		<i>R. raoultii</i>
		<i>R. rhipicephali</i>
	Grupo <i>Rickettsia helvetica</i>	<i>R. asiatica</i>
		<i>R. helvetica</i>
		<i>R. monacensis</i>
		<i>R. tamurae</i>
	Grupo <i>Rickettsia akari</i>	<i>R. akari</i>
		<i>R. australis</i>
		<i>R. felis</i>
Grupo tifus (GT)	Grupo <i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>R. prowazekii</i>
		<i>R. typhi</i>
Grupo “ancestral”	Grupo <i>Rickettsia canadensis</i>	<i>R. canadensis</i>
	Grupo <i>Rickettsia belli</i>	<i>R. monteiroi</i>
		<i>R. belli</i>

1.2.4.1. Epidemiología

En Europa las rickettsiosis son enfermedades transmitidas por garrapatas duras, que actúan como vectores, aunque en muchas ocasiones también pueden actuar como reservorios. Las dos enfermedades más prevalentes son la Fiebre botonosa mediterránea (“*Mediterranean Spotted Fever*”, MSF) causada por *Rickettsia conorii* y la linfadenopatía transmitida por garrapatas producida fundamentalmente por *Rickettsia slovaca* (Raoult *et al.*, 1986). En la

actualidad se ha demostrado que, aunque *R. conorii* se considera el principal causante de la MSF, hay otras especies de *Rickettsia* como *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia massiliae* y *Rickettsia aeschlimannii* que originan una enfermedad con una sintomatología similar (Portillo *et al.*, 2009).

Como se dijo anteriormente, en Europa la rickettsiosis más extendida, especialmente en el este y en el sur de este continente, es la MSF causada por *R. conorii* subsp. *conorii* (Figura 1.23.).



Andalucía, en el 9% de los de Cataluña y en el 5% de los de Madrid. También se han realizado estudios para determinar las principales especies de *Rickettsia* que infectan a la población, aislando *Rickettsia typhi* y *Rickettsia felis* en las Islas Canarias (Oteo *et al.*, 2003; Pérez-Arellano, *et al.*, 2005); *R. felis*, *R. slovaca* y *R. raoultii* en La Rioja (Oteo *et al.*, 2006); *R. monacensis* en La Rioja y País Vasco y *Rickettsia sibirica mongolitimonae* en el País Vasco (Aguirrebengoa *et al.*, 2008). En Portugal las rickettsiosis producidas por *R. conorii* parecen más frecuentes en las zonas rurales del este, siendo menos frecuentes en las zonas costeras (Kreuzpaintner y Tischendorf, 2001). En Italia se encontraron grandes diferencias entre las prevalencias detectadas en el norte (4% en Friuli-Venezia Giulia) y en el sur (37% en Sicilia) del país (Cinco *et al.* 2006; Livio *et al.* 2007).

En Francia las rickettsiosis son una de las enfermedades transmitidas por garrapatas que presentan mayor prevalencia, con seropositividades que oscilan entre el 1-2% para *R. conorii*, del 0,2-0,54% para *R. typhi*, del 0-0,2% para *Rickettsia akari* y del 0,43-0,6% para *R. felis* (Brouqui *et al.*, 2005; Drancourt *et al.*, 2008). En Alemania se observó que la seroprevalencia en cazadores era del 0,70% para *R. helvetica* y del 2,10% para *R. aeschlimannii* (Jansen *et al.*, 2008).

Las especies de *Rickettsia* descritas a continuación se han identificado como patógenos en Europa, en la Figura 1.24. se muestra su distribución así como la distribución mundial de las diferentes especies.

-*Rickettsia conorii* subsp. *conorii*: es el agente causal de la fiebre botonosa mediterránea, enfermedad endémica en el sur de Europa presentándose de forma esporádica en el norte y centro de Europa. El vector y potencial reservorio de esta enfermedad en la zona mediterránea es *R. sanguineus* (Parola *et al.*, 2006 y 2013). Se ha sugerido que los erizos podrían actuar como reservorio de la enfermedad, aunque todavía no se ha confirmado (Bitam *et al.*, 2006; Parola *et al.*, 2009).

-*Rickettsia conorii* subsp. *israelensis*: ocasiona la fiebre botonosa israelí. El perro se considera un reservorio competente de la enfermedad (Giammanco *et al.*, 2005; de Sousa *et al.*, 2007).

-*Rickettsia massiliae*: se ha identificado en *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. pusillus*, *R. bursa* y en *I. ricinus*, con positividades que oscilan entre el 2 al 92% (Marie *et al.*, 2012; Renvoise *et al.*, 2012).

-*Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae*: causa la rickettsiosis asociada a linfagitis también denominada LAR (“*Lymphagitis-Associated Rickettsiosis*”). En Europa esta *Rickettsia* parece estar relacionada con *Hyalomma anatolicum excavatum* (Chochlakis *et al.*, 2012).

-*Rickettsia slovacae* y *Rickettsia raoultii*: ambas se relacionan con un síndrome asociado con la aparición de escaras en el cuero cabelludo y linfadenopatía de los ganglios situados en el cuello. Este síndrome recibe el nombre de SENLAT (“*Scalp Eschars and Neck Lymphadenopathy following tick bites*”), aunque previamente se denominaba TIBOLA (“*Tick-Borne Lymphadenopathy*”) o DEBONEL (“*Dermacentor-Borne Necrotic Erythema and Lymphadenopathy*”). Estos patógenos parecen estar relacionados con *D. marginatus* y *D. reticulatus* (Jiang *et al.*, 2012; Maioli *et al.*, 2012; Masala *et al.*, 2012). Sin embargo, ambas especies de *Rickettsia* también se han detectado recientemente en *I. ricinus*, aunque en este caso se desconoce su capacidad vectorial (Chmielewski *et al.*, 2009; Reye *et al.*, 2013). Esta enfermedad se ha diagnosticado en Francia, Eslovaquia, Alemania, Hungría, España y Polonia (Parola *et al.*, 2009; Sekeyova *et al.*, 2012).

-*Rickettsia monacensis*: se identificó como patógena en el 2005 (Jado *et al.*, 2007; Madeddu *et al.*, 2012). Los pacientes afectados presentan síntomas similares a los de un resfriado. En un paciente italiano se observó una escara de inoculación, mientras que en pacientes españoles se observó un sarpullido generalizado en palmas y plantas de los pies (Jado *et al.*, 2007; Madeddu *et al.*,

2012). Esta especie se ha detectado en *I. ricinus* de la mayoría de los países europeos con prevalencias entre el 1 y el 57% (Reye *et al.*, 2010; Radulovic *et al.*, 2011; Gargili *et al.*, 2012; Rymaszewska y Piotrowski, 2013). En el 2012 se encontró ADN de *R. monacensis* en lagartos y en los *I. ricinus* que los parasitaban (de Sousa *et al.*, 2012), por lo que se sugirió que estos animales podrían actuar como reservorio de esta especie.

-*Rickettsia aeschlimannii*: se ha detectado en *H. marginatum marginatum* y en *H. marginatum rufipes* procedentes de diferentes países europeos, aunque se sospecha que su origen es africano, siendo las aves migratorias quienes trasladan las garrapatas de un continente a otro (Hornok *et al.*, 2013; Tomassone *et al.*, 2013). Los síntomas producidos son similares a los causados por la fiebre botonosa mediterránea.

-*Rickettsia helvetica*: el principal vector y reservorio es *I. ricinus*, aunque también se ha detectado en *I. hexagonus*, *Ixodes arboricola* y *D. reticulatus* (Dobec *et al.*, 2009; Spitalska *et al.*, 2011). También se ha encontrado ADN de esta especie de *Rickettsia* en una amplia variedad de vertebrados como jabalíes, cérvidos y ratones (Sprong *et al.*, 2009). No se conoce con exactitud cuál es el potencial patógeno de esta *Rickettsia*, aunque se relaciona con síntomas inespecíficos como dolor muscular y de cabeza que no se asocian con la aparición de escaras o sarpullidos (Parola *et al.*, 2005).

-*Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*: causa el tifus siberiano transmitido por garrapatas, también denominando STT (“*Siberian Tick Typhus*”) y también produce una linfagitis asociada a la picadura de *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (Walker *et al.*, 2003; de Sousa *et al.*, 2006; Ibarra *et al.*, 2012; Parola *et al.*, 2013). En España, Palomar *et al.* (2012) detectaron esta *Rickettsia* en *I. ricinus*, sugiriendo que los pájaros podrían tener un importante papel en el transporte de estas garrapatas de un continente a otro.

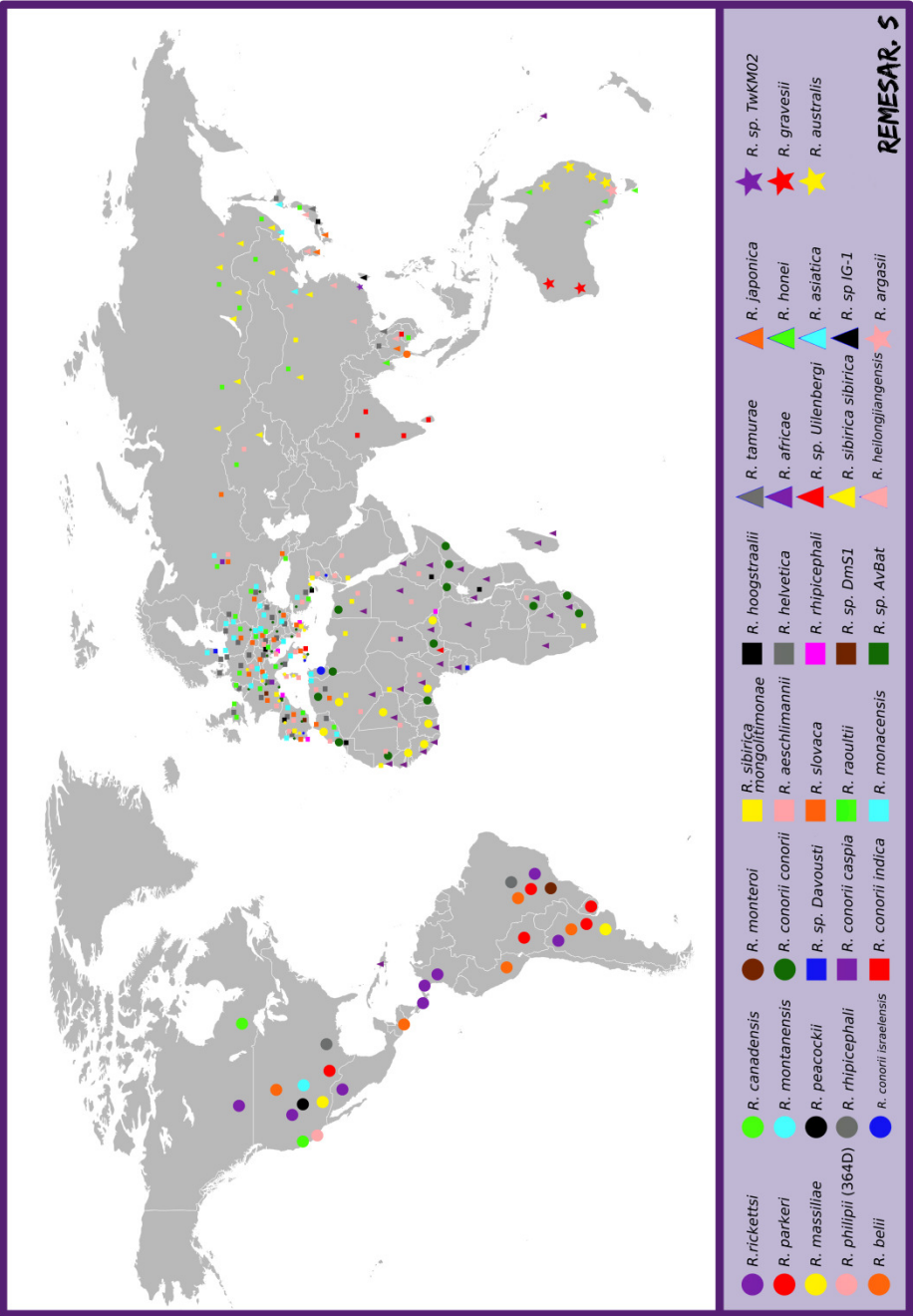


Figura 1.24. Distribución mundial de las diferentes especies de *Rickettsia* spp.

-Otras especies de *Rickettsia* detectadas en Europa: en este grupo se incluyen especies que se han descrito de forma incompleta o especies no cultivadas, pero que se han detectado mediante el uso de técnicas moleculares.

-*Candidatus Rickettsia tarasevichiae* identificada en *I. persulcatus* de Rusia (Eremeeva *et al.*, 2006).

-*Candidatus Rickettsia barbariae* encontrada en *R. sanguineus* de Portugal, Italia, Francia y Chipre (Mura *et al.*, 2008; Chochlakis *et al.*, 2012, Socolovschi *et al.*, 2012).

-*Candidatus Rickettsia vini* detectada en *I. arboricola* y en *I. ricinus* de España (Palomar *et al.*, 2012).

-*Rickettsia* sp. strain DmS1 detectada en España y Francia, se considera que *D. marginatus* es el reservorio de la enfermedad (Fernández-Soto *et al.*, 2006; Socolovschi *et al.*, 2009).

-*Candidatus Rickettsia rioja*, detectada en *D. marginatus* recolectados de pacientes de España y Francia que mostraban el síndrome SENLAT (Portillo *et al.*, 2009; Pérez-Pérez *et al.*, 2010).

1.2.4.2. Vectores

Entre los principales vectores de *Rickettsia* se encuentran garrapatas duras y blandas, pulgas, piojos, moscas blancas, mosquitos, piojos de los libros y ácaros (Merhej *et al.*, 2014). Las rickettsias pertenecientes al grupo de la fiebre botonosa mediterránea se asocian principalmente con garrapatas y las del grupo tifoideo con pulgas y piojos (Parola *et al.*, 2013). En Europa los ixódidos se han confirmado como vectores y reservorios de la mayoría de las principales rickettsias patógenas (Parola *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2015). Sin embargo, su rol como reservorios de ciertas especies como *R. sibirica mongolitimonae* y *R. monacensis* no se ha comprobado todavía (Merhej *et al.*, 2014). La transmisión en garrapatas puede ser por coalimentación (Socolovschi *et al.*, 2009) y también transestadialmente o transovaricamente (Parola y Raoult, 2001).

En la Tabla 1.13. se resume la distribución de las principales especies de *Rickettsia* en Europa (Parola *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2015). Algunas se asocian con determinadas especies de garrapatas, mientras que otras se pueden hallar en un elevado número de especies (Parola *et al.*, 2013).

Tabla 1.13. Distribución de las especies de *Rickettsia* y sus vectores en Europa

Vector	Enfermedad asociada	Distribución
<i>R. aeschlimannii</i>		
<i>H. marginatum</i> <i>marginatum</i> , <i>H. anatolicum</i> <i>excavatum</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>R.</i> <i>sanguineus</i> , <i>R. turanicus</i> , <i>R.</i> <i>bursa</i>	Fiebre manchada	Área mediterránea, África
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>		
<i>R. pumilio</i> , <i>R. sanguineus</i>	Fiebre de Astracán	Astracán, Kosovo, Chad.
<i>R. conorii</i> subsp. <i>conori</i>		
<i>R. pumilio</i> , <i>R. sanguineus</i>	Fiebre manchada mediterránea	Área Mediterránea
<i>R. conori</i> subsp. <i>indica</i>		
<i>R. sanguineus</i> , <i>B.</i> <i>microplus</i> , <i>Haemaphysalis</i> <i>leachii</i>	Tifus indio transmitido por garrapatas, Fiebre manchada mediterránea	India, Pakistán
<i>R. conori</i> subsp. <i>israelensis</i>		
<i>R. sanguineus</i>	Tifus israelí transmitido por garrapatas, Fiebre manchada mediterránea	Israel, Portugal, Italia
<i>R. helvetica</i>		
<i>I. ricinus</i>	MSF-like	Europa, Asia central
<i>R. massiliae</i>		
<i>R. turanicus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. pusillus</i> , <i>I.</i> <i>ricinus</i>	MSF-like	Área mediterránea, América (excepto Canadá y Alaska)
<i>R. monacensis</i>		
<i>I. ricinus</i>	Fiebre manchada	Europa
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>		
<i>H. anatolicum excavatum</i> , <i>R. pusillus</i> , <i>H. asiaticum</i> , <i>H.</i> <i>truncatum</i>	LAR (“ <i>Lymphangitis- Associated Rickettsiosis</i> ”) Fiebre manchada mediterránea	Sur de Europa, África
<i>R. raoultii</i>		
<i>D. marginatus</i> , <i>D.</i> <i>reticulatus</i>	SENLAT (“ <i>Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy After Tick bite</i> ”)	Europa

Tabla 1.13. (continuación)

Vector	Enfermedad asociada	Distribución
<i>R. slovac</i>		
<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	SENLAT	Europa
<i>Candidatus Rickettsia rioja</i>		
<i>D. marginatus</i>	SENLAT	Europa
<i>R. rhipicephali</i>		
<i>R. sanguineus</i>	Patógeno potencial	-
<i>R. hoogstraalii</i>		
<i>H. sulcata</i>	Patógeno potencial	-
<i>R. genotipo AcBAT</i>		
<i>A. vespertilionis</i>	Patógeno potencial	-

1.2.4.3. Hospedadores

Solo algunas especies animales pueden actuar como reservorios de *Rickettsia* puesto que son infectantes para las garrapatas durante un periodo de tiempo más o menos largo (Eremeeva y Dasch, 2015). Además, como se comentó en otras ocasiones, cuando un mismo vector puede transmitir las bacterias de manera eficiente, tanto de forma transestadial como transovárica, éste puede actuar como reservorio (Parola y Raoult, 2001); por este motivo ciertas especies de garrapatas además de ser hospedadores de *Rickettsia* son reservorios de esta bacteria. Sin embargo el papel desempeñado por ciertos animales en el ciclo biológico de este patógeno aún no se conoce totalmente.

En la Tabla 1.14. se resume la distribución en Europa de las especies de *Rickettsia*, vectores, reservorios (marcados con un asterisco *) y hospedadores (Parola *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2015).

Las personas son hospedadores accidentales y no intervienen en la propagación de estos microorganismos en la naturaleza excepto en el caso del Tifus Exantémico o epidémico (TE) ocasionado por *Rickettsia prowazekii* y transmitido por *Pediculus humanus corporis*, que tiene a las personas como principal reservorio (Saah, 2002).

Tabla 1.14. Principales vectores y reservorios /hospedadores de las diversas especies de *Rickettsia* y su distribución en Europa

Vector	Reservorio/ Hospedador	Distribución
<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>		
<i>R. sanguineus</i>	<i>R. sanguineus</i> *, Perro, Erizo	Sur de Europa (Serbia, Rumania, Eslovaquia, Malta, Italia, España)
<i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>		
<i>R. sanguineus</i>	Perro*	Italia, Portugal
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>		
<i>R. sanguineus</i>	-	Rusia, Francia
<i>R. massiliae</i>		
<i>Rhipicephalus</i> spp.	Conejo*, Gorrión, Perro, Caballo, Gato, Erizo, Zorro, Liebre, Cabra	Francia, Italia, España, Grecia, Chipre
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>		
<i>H. excavatum</i>	-	Grecia, Chipre, Francia, Portugal, España
<i>R. pusillus</i>		
<i>R. bursa</i>		
<i>R. slovaca</i> y <i>R. raoultii</i>		
<i>D. marginatus</i>	Oveja, Cabra, Vaca	Francia, Eslovaquia, Italia, Alemania, Hungría, España, Polonia
<i>D. reticulatus</i>		
<i>R. monacensis</i>		
<i>I. ricinus</i>	Lagarto*	España, Portugal, Italia, Turquía, Suiza, Luxemburgo, Alemania, Suiza, Eslovaquia, Albania, Hungría, Bulgaria, Moldavia, Ucrania, Serbia, Rusia, Bielorrusia, Polonia
<i>R. aeschlimannii</i>		
<i>H. marginatum</i>	Aves	Croacia, España, Francia, Portugal, Italia, Rusia, Chipre, Alemania, Turquía, Hungría, Grecia
<i>H. marginatum</i>		
<i>H. marginatum rufipes</i>		
<i>R. helvetica</i>		
<i>I. ricinus</i>	<i>I. ricinus</i> *, Erizo, Oveja,	Dinamarca, Alemania, Rep.
<i>I. hexagonus</i>	Lagarto, Ratón, Ciervo,	Checa, Croacia, Portugal,
<i>I. arboricola</i>	Jabalí	Países bajos, Francia, Italia,
<i>D. reticulatus</i>		Suiza, Eslovaquia, Austria,
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>		
<i>I. ricinus</i>	Aves	España
<i>R. rhipicephali</i>		
<i>R. sanguineus</i>	Perro, Cobaya	Francia, Portugal, Grecia, Croacia

En relación con los carnívoros, los perros se consideran centinelas de *R. rickettsii* y *R. conorii* (Nicholson *et al.*, 2010; Ereemeeva *et al.*, 2015) y padecen sintomatología clínica. Según otros autores (Kelly y Mason, 1991; Kelly *et al.*, 1992) cuando los perros se infectan por otras especies de *Rickettsia*, la infección cursa de manera subclínica. No obstante, aunque se ha demostrado que los perros son un reservorio competente de *R. conorii* no lo son de otras especies de *Rickettsia* (Levin *et al.*, 2012).

En general, se admite que los perros constituyen un riesgo de infección para los humanos, bien mediante el contacto del patógeno a través de las membranas mucosas o bien a través de garrapatas infectadas (Pinna *et al.*, 1997). También pueden actuar como hospedadores de mantenimiento de las garrapatas (Nicholson *et al.*, 2010) y como hospedadores de coalimentación (Ereemeeva *et al.*, 2015).

El papel de los gatos en la transmisión/mantenimiento de *Rickettsia* está menos estudiado (Reif y Macaluso., 2009); sin embargo, Segura *et al.* (2014) detectaron ADN de *R. massiliae* en garrapatas procedentes de gatos, lo que indicaría que podrían actuar como fuente de infección en un ciclo peridoméstico.

1.2.4.4. Ciclo de vida

El ciclo de las diversas especies de *Rickettsia* se resume en la Figura 1.25. Cuando una garrapata, pulga o piojo infectado por esta bacteria se alimenta de un hospedador vertebrado, las rickettsias se diseminan por los vasos linfáticos del hospedador hasta llegar a los linfonodos, y a través del torrente sanguíneo hacia todos los órganos. En general, todas las rickettsias muestran una clara afinidad por el endotelio, aunque en ocasiones, pueden afectar a los macrófagos. Una vez que las bacterias han penetrado en el interior de la célula, en el caso del tifus, comienzan a multiplicarse y a acumularse hasta provocar lisis celular, mientras que las rickettsias causantes de las fiebres manchadas salen a través de su membrana produciendo la entrada de agua (Walker *et al.*, 2003).

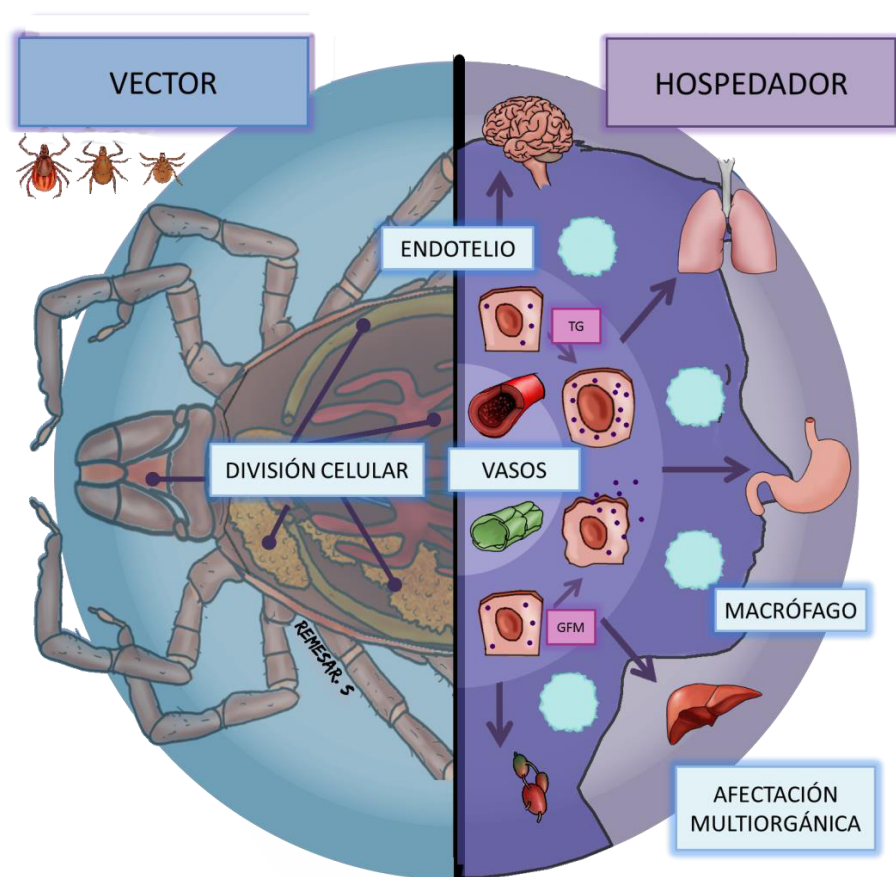


Figura 1.25. Ciclo de las especies de *Rickettsia*

Para que se produzca la invasión celular es necesaria la adherencia de las rickettsias sobre la superficie celular. Para ello las bacterias expresan unas proteínas de membrana externa como la *rOmpA* y *rOmpB* en las bacterias del grupo fiebre manchada y del *rOmpB* en las del grupo del tifus.

Es importante destacar que los genes que codifican las proteínas de membrana *rOmpA* y *rOmpB* de *Rickettsia* spp. se utilizan para detectar este patógeno. No obstante, no todos se hallan en todas las especies; así el gen *rOmpB* está ausente en *R. canadensis* y el gen

rOmpA se encuentra como pseudogen en *R. felis* y *R. akari* y fragmentado en *R. bellii*. Así mismo, este gen no se amplifica en *R. helvetica*, *R. canadensis* ni en las rickettsias pertenecientes al grupo del tifus (Ngwamidiba *et al.*, 2006).

Las especies de *Rickettsia*, al igual que sucede con las de *Babesia*, se multiplican en todos los órganos de la garrapata, incluidos los ovarios y las glándulas salivales. Esta multiplicación permite que se produzca la transmisión tanto transestadial como transovárica de la bacteria, por lo que, como se dijo anteriormente, el artrópodo puede considerarse tanto un vector de transmisión del patógeno como un reservorio del mismo. Algunas especies de *Rickettsia*, como *R. slovaca*, no se multiplican en las glándulas salivales del vector, por lo que no se podrían transmitir mediante la picadura del mismo. Sin embargo se eliminan a través de las heces de algunas garrapatas, como *D. marginatus*, que permitiría la transmisión del patógeno a través del contacto directo con heridas de la piel (Parola *et al.*, 2005).

1.2.4.5. Manifestaciones clínicas

A continuación se describe la sintomatología en personas de las principales enfermedades producidas por las diferentes especies de *Rickettsia* presentes en Europa:

- Fiebre botonosa mediterránea (MSF) y MSF-like: se caracteriza por la aparición de una costra o mancha negra en la zona de picadura de la garrapata. En todos los casos se manifiesta con fiebre repentina acompañada de escalofríos, cefalea y mialgia. Después de 3 a 5 días tras la aparición de la fiebre se observa una erupción maculo-papulosa en las extremidades (Portillo *et al.*, 2015). El pronóstico de esta enfermedad es generalmente bueno y presenta baja mortalidad.

- TIBOLA/DEBONEL/SENLAT: las manifestaciones clínicas incluyen la aparición de escaras en el lugar de picadura de la garrapata junto con una zona de eritema y linfadenopatía regional que puede resultar dolorosa (Portillo *et al.*, 2015). Los pacientes

no suelen presentar fiebre o se reduce a una ligera febrícula, además no suelen haber manifestaciones sistémicas.

-Linfagitis asociada a rickettsiosis (LAR): los enfermos suelen presentar fiebre elevada y escara en el punto de inoculación que puede ser múltiple en algunos casos. Aunque son pocos los casos estudiados, la mitad de los pacientes suelen presentar linfadenopatías regionales y linfagitis (Fournier *et al.*, 2005).

Aunque la mayoría de perros seropositivos a *Rickettsia* spp. no presentan síntomas, en ocasiones se ha descrito la aparición de fiebre, hiperestesia, edema periférico, eritema, linfadenomegalia, petequias, equimosis y taquicardia, entre otros, especialmente en animales infectados por *R. rickettsii*, sin embargo, y aunque en ocasiones se le atribuye unos signos clínicos similares, existe poca información acerca de la infección producida por *R. conorii* (Greene, 2012).

En gatos, algunos autores asociaron la aparición de linfadenopatía y policitemia con la infección por *R. felis*, sin embargo, no se sabe demasiado acerca de su patogenicidad (Pennisi *et al.*, 2017).





OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes expuestos, nos planteamos los siguientes objetivos:

1º. Identificar las especies de garrapatas exófilas presentes en la vegetación del noroeste de la península ibérica, mediante estudios morfológicos y aplicación de métodos basados en la biología molecular.

2º. Estudiar la abundancia en la vegetación, así como la dinámica estacional de las distintas especies de garrapatas.

3º. Relacionar distintos factores epidemiológicos con la abundancia de poblaciones de garrapatas en el medio.

4º. Estudiar la presencia mediante técnicas moleculares de algunos agentes zoonóticos bacterianos, en particular *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. y *Anaplasma* spp. en las garrapatas presentes en la vegetación de esas áreas.

5º. Determinar mediante técnicas moleculares la presencia de distintas especies de piroplasmas que afectan a los ungulados domésticos y silvestres (*Babesia* spp. y *Theileria* spp.) en las garrapatas recogidas en esos ambientes.

6º. Establecer la distribución geográfica y por especies de garrapatas de los distintos agentes patógenos investigados.





MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral se dividen en tres subapartados. En el primero se describirá brevemente la zona de estudio, en el segundo se incluirá el muestreo, la identificación de las garrapatas capturadas y la recogida de datos y análisis estadísticos empleados para el estudio de la dinámica poblacional de las garrapatas, y en el último subapartado se describirá la detección y tipificación de las especies de patógenos presentes en las garrapatas.

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO

La provincia de Lugo (Galicia) está situada en el Noroeste de España (42° 20' - 43° 45' N y 6° 49' - 8° 00' O). Esta provincia limita al norte con el Mar Cantábrico, al sur con la provincia de Ourense, al oeste con las de A Coruña y Pontevedra y al este con las Comunidades Autónomas de León y del Principado de Asturias. En cuanto a la orografía, la provincia de Lugo se caracteriza por estar ocupada en su mayoría por una meseta de 500 metros de altitud media rodeada por cadenas montañosas; al norte están las Sierras Septentrionales (Serra do Xistral, da Toxiza, da Cadeira, etc.), mientras que, al este y al sureste están las Sierras Orientales (Meira, Ancares, Courel, etc.).

El área de estudio tiene un clima oceánico que, según Rodríguez-Rajo *et al.* (2003), se caracteriza por ligeras variaciones de temperatura, siendo la media anual de 11,5°C y las medias de las temperaturas máximas y mínimas de 16,8°C y 6,2°C, respectivamente. Las precipitaciones medias anuales (963 mm) son abundantes, aunque irregulares, registrándose los valores más elevados en los meses de invierno (124,8 mm) y los más bajos en los de verano (20 mm). No obstante, dentro de la provincia existen variaciones climáticas notables (Carballeira *et al.*, 1983) que permiten establecer tres zonas denominadas costa, meseta y montaña, descritas previamente por Lago *et al.* (2012). Los parámetros climáticos y geográficos que las

caracterizan se resumen en la Tabla 3.1., y se obtuvieron de la Agencia Meteorológica de Galicia (<http://www.meteogalicia.gal>).

Tabla 3.1. Principales parámetros climáticos y orográficos medios anuales que caracterizan cada una de las áreas de estudio

Parámetros	Costa	Meseta	Montaña
Temperatura media anual (°C)	12,7	11,7	10,9
Humedad relativa media (%)	82,8	81,3	79,5
Días de helada (días)	0,2	2,1	3,5
Velocidad del viento (m/s)	2,8	2,6	3,3
Horas de sol (horas)	87,2	77,3	88,0
Precipitaciones (l/m ²)	130,4	186,0	174,0
Pendiente media (%)	13-25	<13	>25
Altitud media (m)	0-200	200-650	>650

En el mapa (Figura 3.1.) se reflejan las estaciones meteorológicas que se utilizaron para calcular los parámetros climáticos medios de la provincia de Lugo, así como las tres diferentes zonas climáticas. En un color más oscuro se señalan los ayuntamientos en los que se realizaron los muestreos.

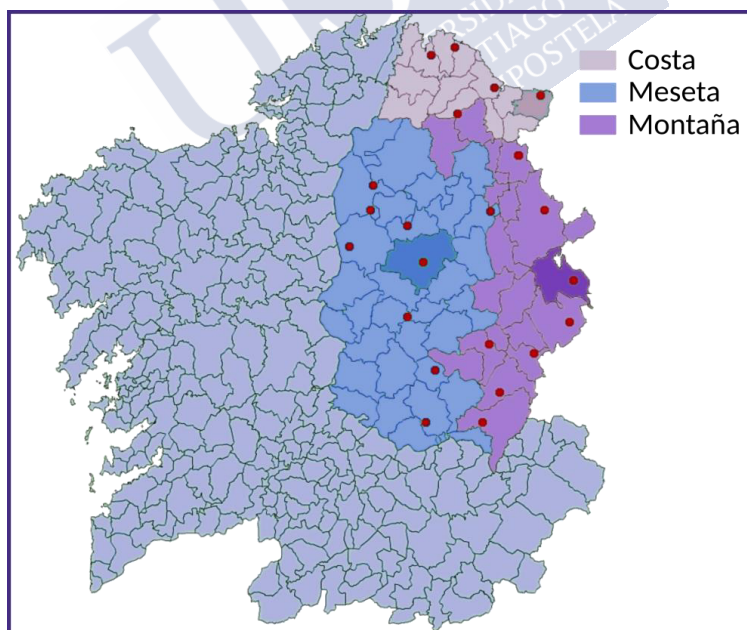


Figura 3.1. Situación de las estaciones meteorológicas y de los ayuntamientos en los que se realizó el muestreo de las garrapatas

3.2. DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS GARRAPATAS

3.2.1. Muestreo

Para la realización de este estudio, se seleccionó una zona de muestreo representativa de cada una de las zonas climáticas anteriormente descritas. La localización de cada área de muestreo así como la localización de cada estación meteorológica se encuentra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Situación de cada una de las áreas de muestreo

Estaciones meteorológicas	Longitud	Latitud	Altitud
Costa (Ribadeo, Pedro Murias)	43° 30'38,1" N	6° 44'37,3" O	51 m
Meseta (Lugo, Campus de Lugo)	42° 59'54,8" N	7° 31'46,3" O	400 m
Montaña (Navia de Suarna, Ventosa)	42° 54'39.7" N	6° 58'53,3" O	910 m

Para poder conocer la estacionalidad de las garrapatas, así como la dinámica de infección de los diferentes agentes patógenos estudiados, la recogida de las garrapatas se realizó durante 2 años consecutivos (noviembre del 2015 a octubre del 2017), realizando 3 muestreos mensuales (uno en cada una de las zonas de muestreo).

Para capturar las garrapatas se empleó el método del bandereo o “*flagging*” (Estrada-Peña, 2002; García-SanMartín *et al.*, 2008; Estrada-Peña *et al.*, 2013), que consiste en utilizar un trozo de tela que imita a un hospedador (Walker *et al.*, 2003). Así, se utilizó una tela de algodón de 1 m² a la que se le colocó un listón de madera de 1,5 m para facilitar su arrastre por la vegetación (Figura 3.2.). Para recoger las garrapatas, la bandera se arrastró por el suelo o se ondeó sobre la superficie de la vegetación, dependiendo del tipo de vegetación presente.



Figura 3.2. Recolección de garrapatas por el método del bandereo

En cada muestreo participaron dos personas, siempre las mismas, para impedir que la forma de realizar la captura alterase el número total de garrapatas recogidas. En cada una de las 3 zonas se muestreó una distancia de unos 300 m ya que, para determinar la densidad de garrapatas, es necesario muestrear una distancia definida y se recomienda que ésta no sea inferior a 100 m (Randolph, 2000; Tälleklint-Eisen y Lane, 2000). El muestreo se detuvo cada 5-10 metros para voltear la bandera sobre la vegetación y recoger las garrapatas que se habían adherido a la tela, evitando así que las garrapatas adheridas cayeran de nuevo al suelo (Estrada-Peña *et al.*, 2013). Por este motivo, el tiempo de muestreo varió dependiendo de la cantidad de garrapatas en el medio, desde aproximadamente 45 minutos cuando las poblaciones de garrapatas eran reducidas, a varias horas cuando éstas eran muy abundantes. Las garrapatas se introdujeron en un bote de tapa de rosca con alcohol al 70% hasta su identificación en el laboratorio.

Como se indicó en el apartado 1.1.6. de los Antecedentes, es importante tener en cuenta que el método del bandereo no permite detectar todas las especies de garrapatas, ya que no es adecuado para

valorar la actividad de las garrapatas endófilas; en estos casos sería necesario recogerlas directamente del hospedador o de los nidos o madrigueras donde habitan sus hospedadores (Estrada-Peña *et al.*, 2013). Por ello, esta técnica no es eficaz para valorar la dinámica de las poblaciones de los estadios inmaduros de *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*, ni de los adultos de este último género (Estrada-Peña *et al.*, 2013).

3.2.2. Identificación, etiquetado y preservación de las garrapatas

En el laboratorio se realizó la identificación morfológica de los ejemplares parasitarios utilizando una lupa binocular y las claves de Estrada-Peña *et al.* (2014) y Pérez-Eid (2007). Para lograr la correcta visualización de las diferentes estructuras de las larvas, éstas se montaron entre porta y cubre empleando Líquido de Hoyer.

Una vez identificadas las garrapatas, éstas se introdujeron en tubos de vidrio con etanol absoluto y se conservaron a -30°C. El etiquetado de las muestras se realizó con papel y lápiz para evitar que éste se borrara en contacto con el alcohol. En cada etiqueta se incluyó el número de identificación de la muestra, lugar de captura, fecha, número de garrapatas adultas recolectadas, sexo de las mismas, número de ninfas y de larvas, así como el género y especie de cada una de las garrapatas (Figura 3.3.).

1.3 Río Rato.		05/10/2016
1 Ninfa <i>I. ricinus</i>	1 Larva <i>I. ricinus</i>	
2 ♂ <i>D. marginatus</i>	2 Ninfa <i>I. frontalis</i>	

Figura 3.3. Modelo de etiqueta de identificación de las muestras

De cada especie de garrapata identificada se seleccionaron dos ejemplares, considerando el sexo y estadio, que se conservaron en etanol al 70%, para posteriormente obtener imágenes bajo la lupa y por microscopía electrónica de barrido (MEB). Además, se realizaron microfotografías de los diferentes estadios y especies utilizando una lupa asociada a una cámara fotográfica digital (Moticam 10.0 MP, Motic®, China) empleando el software Motic Images Plus 2.0. Posteriormente estas imágenes se montaron con el apoyo de una tableta digitalizadora (Intuos Pro, Wacom Co.®, Saitama, Japón) y el software GIMP (GIMP - GNU Image Manipulation Program). Debido a que las imágenes obtenidas mediante MEB permiten visualizar y medir ciertas estructuras de las garrapatas que no podrían valorarse mediante otras técnicas, parte de los ejemplares conservados se enviaron al servicio de microscopía electrónica y confocal de la Universidade de Santiago de Compostela (USC).

Además, la identificación microscópica de las especies de garrapatas encontradas se confirmó mediante el estudio molecular de como mínimo 2 ejemplares de cada uno de los estadios de las diferentes especies recolectadas. La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemania), siguiendo el protocolo específico para sangre y tejidos recomendado por el fabricante. Con objeto de obtener una mayor concentración de ADN, se utilizó un menor volumen de tampón de elución (100 µl) y se alargó el tiempo de la primera incubación de 1 a 6 horas. Para facilitar la acción del tampón de lisis sobre las garrapatas, éstas se cortaron longitudinalmente con un bisturí e, individualmente, se homogenizaron empleando un homogeneizador de tejidos (MagNaLyser, Roche®, Alemania) a 6.000 rpm durante 60 segundos. La hoja de bisturí se desinfectó con hipoclorito sódico entre garrapatas para evitar la contaminación con ADN de otros ejemplares.

Con este procedimiento, en primer lugar, se llevó a cabo la rotura celular tras incubar la muestra con un tampón de lisis y la enzima Proteínasa K, junto a un compuesto denominado Guanidina-HCl, que

inactivó todas las nucleasas. Posteriormente, los ácidos nucleicos se unieron selectivamente a las fibras de vidrio que forman el filtro del tubo de filtración y el ADN se purificó mediante varios lavados que eliminan los restos de los componentes celulares. Por último, el ADN se eluyó empleando una solución de sales débiles que liberan los ácidos nucleicos de la fibra de vidrio. Con este método se evita el empleo de disolventes orgánicos y la precipitación del ADN, lo que permite la rápida purificación de un elevado número de muestras de forma simultánea. Las muestras obtenidas mediante este procedimiento se conservaron en congelación a -30°C en microtubos de 1,5 ml.

Para poder realizar la identificación molecular de las garrapatas, las muestras se procesaron mediante una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad pequeña (16S) del ARN ribosómico (ARNr), siguiendo los protocolos descritos por Simon *et al.* (1994) y Norris *et al.* (1996). Los fragmentos obtenidos tras la realización de la última reacción de amplificación se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para ello se cargaron 10 μl del producto de PCR, junto con 2 μl de buffer de carga, en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris, acetato y EDTA) 1x; posteriormente se aplicó un voltaje de 100 V durante 40-60 min. El gel se visualizó en un analizador de imagen Fluor-S Multimager (BioRad®, California, EE.UU.). Las bandas de ADN se evidenciaron mediante tinción con un sustituto del bromuro de etidio (Red Safe, REAL®, Valencia, España).

La purificación de las muestras positivas y la determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la USC. Los productos de amplificación se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator v3.1 Kit® (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y se leyeron en un secuenciador automático ABI-prism 3730xl. Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon con el programa Chromas Pro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin®, Queensland, Australia) y posteriormente se alinearon con BioEdit

Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences®, Carlsbad, California, EE.UU.). Finalmente, la identificación de las especies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas depositadas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.3. Variables para el estudio de la dinámica poblacional de las garrapatas y análisis estadístico

La obtención de garrapatas de la vegetación permite estimar su densidad y relacionarla con diferentes factores ambientales (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014). Las variables consideradas en el estudio fueron la temperatura media, máxima, mínima, temperatura acumulada y temperatura del aire a 10 cm del suelo (°C); el porcentaje de la humedad relativa media, máxima y mínima (%); el punto de rocío (°C) y días de helada. Los datos meteorológicos se obtuvieron a través de la página web <http://www.meteogalicia.gal/web/index.action>, publicada por la Agencia Meteorológica de Galicia. Para ello se seleccionó la estación más próxima a la zona de muestreo la cual, además, tenía que localizarse a una altitud similar; así, se situaron a aproximadamente 3 km. No se emplearon variables relacionadas con la densidad de hospedadores, debido a la ausencia de una base de datos fiable y actualizada.

Aunque la actividad de las garrapatas se ha relacionado con las características de su microclima, especialmente la temperatura y humedad que hay en las capas más bajas de la vegetación, así como la altura a la que están las garrapatas sobre la vegetación cuando esperan a un hospedador (Randolph y Craine, 1995; Corson, *et al.*, 2004), estos datos no se pudieron incluir en el estudio debido a la imposibilidad de disponer de un sistema que permitiera su obtención de manera fiable. Por este motivo, los datos obtenidos fueron una media de los datos de las mediciones diarias realizadas en la estación meteorológica seleccionada para cada una de las áreas de muestreo,

que incluían tanto el día de muestreo como los días transcurridos entre muestreos.

Además, se consideraron los valores del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI “*Normalized Difference Vegetation Index*”) del modo tierra (MOD44) del satélite MODIS, que representan las mediciones medias de 16 días de un área de 5 km alrededor de cada una de las zonas de muestreo. Para la obtención de estos datos se empleó la página web del proyecto GLAM (“*Global Agriculture Monitoring*” <http://pekko.geog.umd.edu/usda/test/>). Esta variable indica la actividad fotosintética de la zona estudiada y permite estimar la calidad, cantidad y desarrollo de la vegetación.

Por último, los valores de fotoperiodo se obtuvieron a través de una hoja de cálculo de Libre Office “NOAA_Solar_Calculations_year.ods”, a través de la página web del Laboratorio de Investigación de Sistemas Terrestres del Departamento de Comercio de EE.UU. “<https://www.esrl.noaa.gov/>”.

Para determinar las variables que podrían estar relacionadas entre sí, se buscaron correlaciones entre ellas empleando el paquete estadístico R (R Core Team, 2018). Una vez conocidas las variables relacionadas, éstas se eliminaron del análisis.

El número total de garrapatas (ninfas o adultos) capturado mensualmente en cada una de las zonas de muestreo y por año se transformó en su fracción acumulada. Posteriormente se aplicó un test de normalidad (Shapiro-Wilk normality test) a la fracción acumulada de ninfas y adultos de *I. ricinus* y, como estos datos no presentaban una distribución normal, se normalizaron empleando la fórmula $\log(1+x)$. Para conocer cómo las diferentes variables estudiadas afectaban a la fracción normalizada acumulada de ninfas y adultos, se aplicó un modelo lineal generalizado mixto (MLGM) mediante los paquetes de R “lme4” y “lmerTest” (Bates *et al.*, 2015; Kuznetsova *et al.*, 2017) considerando como variables aleatorias la zona y el mes de muestreo. Finalmente, las variables se eliminaron una a una siguiendo el criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criteria*, AIC) hasta conseguir el mejor modelo posible.

3.3. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE PATÓGENOS

3.3.1. Cálculo del número de garrapatas a analizar

Con objeto de identificar los patógenos presentes en las garrapatas de la zona de estudio, así como su prevalencia en el vector, el número mínimo de garrapatas a examinar se calculó mediante el programa estadístico R (R Core Team, 2018) y el paquete estadístico “epiDisplay” (Virasakdi, 2015). Según los cálculos realizados, para hallar una diferencia de prevalencias del 10% entre las diferentes zonas de muestreo y entre los diferentes estadios (adultos y ninfas), con un intervalo de confianza del 95% y una precisión del 5%, habría que procesar, como mínimo, 286 garrapatas por zona. Cuando en alguno de los meses no se recogió un número suficiente de garrapatas en alguno de sus estadios, se analizó el total de ejemplares encontrados; en estos casos, las garrapatas necesarias para alcanzar el número calculado se repartieron de forma equitativa entre los meses en los que se recogieron mayor número de garrapatas. Cuando el número de ejemplares para alguna de las especies de garrapatas fue muy reducido, se procesaron todos los ejemplares capturados. De este modo, se analizaron un total de 1.105 garrapatas: 1.056 *I. ricinus*, 19 *D. marginatus*, 17 *D. reticulatus*, 12 *I. frontalis* y 1 *I. acuminatus*. Dos ejemplares de *I. frontalis* fueron empleados para la toma de imágenes mediante microscopía electrónica por lo que no fueron procesados.

3.3.2. Obtención de controles positivos y negativos

Se emplearon diferentes protocolos de PCR para detectar los patógenos vehiculados por garrapatas más frecuentes en la Península Ibérica, y que incluían *Anaplasma*, *Babesia/Theileria*, *Borrelia* y *Rickettsia*. Para ello, se realizaron distintos protocolos de PCR y qPCR. Para comprobar que ninguno de los reactivos empleados en la PCR estaba contaminado, en cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos a

excepción del ADN de las garrapatas, que se sustituyó por el mismo volumen de agua libre de ADNasas y ARNasas (Agua bidestilada, Laboratorios Serra Pamies®, Reus, España).

Para *Anaplasma* spp. se emplearon los controles positivos suministrados con el kit (EXOone *Anaplasma* spp. oneMix, EXOPOL®, Zaragoza, España), así como ADN de *Anaplasma phagocytophilum* extraído de bazo de un corzo positivo. Los controles positivos a *Babesia* spp. y *Theileria* spp. se obtuvieron a partir de varias muestras de sangre de perros con babesiosis diagnosticada mediante frotis sanguíneo, así como los controles del kit (EXOone Piroplasmas oneMix, EXOPOL®, Zaragoza, España). Como controles positivos de *Borrelia* spp., se utilizaron muestras positivas de un trabajo anterior (Díaz *et al.*, 2017). El Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) nos proporcionó los controles positivos a *Rickettsia* spp., concretamente ADN de *Rickettsia amblyommii*, una especie no presente en Europa.

3.3.3. Identificación de los patógenos estudiados

La extracción de ADN se realizó de manera individual para cada una de las garrapatas como ya se mencionó en el apartado 3.2.2. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante diferentes protocolos de PCR convencional (simple y anidada) y de qPCR empleando protocolos descritos previamente (Tabla 3.3.).

La presencia de ADN de *Anaplasma* spp. se detectó en primer lugar mediante una qPCR comercial (*Anaplasma* spp. EXOone, EXOPOL®, Zaragoza, España). Aquellas muestras positivas se genotiparon usando tres PCR convencionales diferentes que amplifican fragmentos de los genes que codifican para la subunidad ribosómica 16S (Chen *et al.*, 1994) y la proteína mayor de membrana 2 (*msh2*) (Massung, 1998), así como del operón *groESL* que codifica para las proteínas de choque térmico *groES* y *groEL* (Liz *et al.*, 2002).

La detección del ADN de *Babesia* spp. y *Theileria* spp. se realizó inicialmente mediante el uso de una qPCR comercial (Piroplasma, EXOone EXOPOL®, Zaragoza, España). Posteriormente las muestras

positivas se caracterizaron molecularmente mediante el análisis de la secuencia parcial del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18S (Zahler *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2011) y del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) (Blaschitz *et al.*, 2008; Bajer *et al.*, 2014).

Para *Borrelia* spp. se amplificó un fragmento del gen de la flagelina (*fla*) mediante el protocolo descrito por Barbour *et al.* (1996) y Stromdahl *et al.* (2003). Las muestras positivas se procesaron nuevamente mediante el uso de una PCR convencional descrita por Derdákova *et al.* (2003) que permite amplificar el espacio intergénico 5S (*rrfA*) - 23S (*rrlB*) (IGS), específico de las espiroquetas del grupo *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.). Además, estas muestras se sometieron a otra PCR convencional que amplifica parcialmente el gen que codifica para la glicerolfosfodiester fosfodiesterasa (*GlpQ*), específico de las borrelias pertenecientes al grupo de la fiebre recurrente (Hovius *et al.*, 2014). Todo ello permitió la detección de co-infecciones *B. burgdorferi* s.l./*B. miyamotoi*.

Para la detección de ADN de *Rickettsia* spp. se amplificaron fragmentos de los genes que codifican para las proteínas de superficie de membrana *rOmpA* y *rOmpB*; posteriormente, las muestras positivas se sometieron a un protocolo de PCR que amplifica el gen que codifica para la enzima citrato sintasa (*glTA*). El gen *rOmpA* está presente únicamente en las especies de *Rickettsia* pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas, así como el *rOmpB*, que además permite detectar especies pertenecientes al grupo de las fiebres tifoideas; sin embargo, como se indicó en Antecedentes 1.2.4. estos dos genes no permiten detectar todas las especies de *Rickettsia* existentes, pues no se ha logrado amplificar el gen *rOmpA* de *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis* y tampoco se ha detectado el gen *rOmpB* en *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis* (Roux y Raoult, 2000). Aunque el gen que codifica para la *glTA* permite detectar una amplia variedad de especies de *Rickettsia*, no permite la identificación de todas (Roux *et al.*, 1997).

Los cebadores y los protocolos empleados para cada uno de los patógenos detectados se resumen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características de los protocolos de PCR convencional empleados para la detección de patógenos

Patógeno detectado	Tipo de PCR	Gen detectado	Nombre cebador	Cebadores Secuencia (5'-3')	Tª hibridación (°C)	(pb)	Referencias
<i>Borrelia</i> spp.	Convencional anidada	Flagelina (<i>fla</i>)	FlaLL	ACATATTACAGTCAGACAGAGGT	55	658	Stromdahl <i>et al.</i> , 2003
			FlaRL	GCAATCATAGCATTGCAGATTGT			
			FlaLS	AACAGCTGAAGAGCTTGAATG	55	354	Barbour <i>et al.</i> , 1996
<i>Borrelia</i> grupo burgdorferi s.l.	Convencional simple	Espacio intergénico <i>rrfA-rrfB</i> (<i>igs</i>)	FlaRS	CTTTGATCACTTATCTATTATAGC			
			IGSa	GTT AAG CTC TTA TTC GCT GAT GGT A			
			IGSb	GCA CCT TCT TCG CCT TAA AGC	58	222-255	Derdákova <i>et al.</i> ., 2003
<i>Borrelia</i> grupo fiebres recurrentes	Convencional simple	Glicerolfosfoliester fosfoliesterasa (<i>GlpQ</i>)	GlpGF	GGT ATG CTT ATT GGT CTT C			
			GlpqR	TTG TAT CCT CTT GTA ATT G	60	920	Hovius <i>et al.</i> , 2014
<i>Rickettsia</i> spp.	Convencional simple	Enzima citrato sintasa (<i>glbA</i>)	CS-78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	58	401	Roux <i>et al.</i> , 1996
			CS-323	GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T			
<i>Rickettsia</i> grupo fiebres manchadas	Convencional semianidada	Proteína de memoria externa A (<i>OmpA</i>)	Rr190-70p	ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA	46	631	Regnery <i>et al.</i> , 1991
			Rr190-70In	GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT			Roux <i>et al.</i> , 1996
			Rr190-70p	ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA	50	532	
<i>Rickettsia</i> grupo fiebres manchadas y tifoideas	Convencional anidada	Proteína de memoria externa B (<i>OmpB</i>)	Rr190-602n	AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT			
			rompBOF	GTA ACC GGA AGT AAT CGT TTC GTA A	54	511	
			rompBOR	GCT TTA TAA CCA GCT AAA CCA CC			Choi <i>et al.</i> , 2005
			RompSFG1F	GTT TAA TAC GTG CTG CTA ACC AA			
			rompBSF1R	GGT TTG GCC CAT ATA CCA TAA G	56	420	
			RIB-19	CGG GAT CCA ACC TGG TTG ATC CTG C	54	1.700	Zahler <i>et al.</i> , 2000
<i>Babesia</i> spp. y <i>Theileria</i> spp.	Convencional anidada	18S rARN	RIB-20	CCG AAT TCC TTG TTA CGA CTT CTC			da Silveira <i>et al.</i> , 2011
			BAB-rumF	ACC TCA CCA GGT CCA GAC AG			
			BAB-rumR	GTA CAA AGG GCA GGG ACG TA	54	430	
<i>Anaplasma</i> spp.	Convencional simple	ITS1	BAITS1-F	CGA GTG ATC CGG TGA ATT ATT C			Blaschitz <i>et al.</i> , 2008
			BAITS1-R	CCT TCA TCG TTG TGT GAG CC	52	600	Bajer <i>et al.</i> , 2014
			HS1	AIT GGG CTG GTA ITG AAA T			
<i>Anaplasma</i> spp.	Convencional anidada	<i>groESL</i>	HS6	CCI CCI GGI ACI AIA CCT TC	48	1900	
			HS43	ATW GCW AAR GAA GCA TAG TC			Liz <i>et al.</i> , 2002
			HSVR	CTC AAC AGC AGC TCT AGT AGC	58	1.297	
<i>Anaplasma</i> spp.	Convencional anidada	16S rRNA	ge3a	CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C			
			ge10r	TTC CGT TAA GAA GGA TCT ATT CTC C	55	932	
			ge9f	AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T			Chen <i>et al.</i> , 1994
			ge2	GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG	55	546	
<i>Anaplasma</i> spp.	Convencional simple	Proteína mayor de membrana 2 (MSP2)	mSP2-3F	CCA GCG TTT AGC AAG ATA AGA G			
			mSP2-3R	GCC CAG TAA CAA CAT CAT AAG C	56	380	Massung <i>et al.</i> , 1998

La purificación de las muestras positivas, la determinación de la secuencia nucleotídica, así como la identificación de especies, se realizó como se indicó en el apartado 3.2.2.

Tras la corrección de las secuencias y su posterior alineamiento, éstas se procesaron con el programa MEGA 7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016) para realizar un árbol filogenético empleando el método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) con un *bootstrap* de 1.000 repeticiones cuyos valores se muestran en las ramas del árbol (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon con el método de máximas probabilidades de composición (*Maximum Composite Likelihood*) (Tamura, Nei y Kumar, 2004).

Aquellas secuencias identificadas como *Anaplasma phagocytophilum* para los genes *groEL* y 16S *ARNr* se alinearon para compararse con las secuencias de referencia identificadas como patógenas para el ser humano (Chen *et al.*, 1994; Sumner *et al.*, 1997) empleando el software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences, Carlsbad, California®, EE.UU).

3.3.4. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Libre Office 2019 y su análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico R (R Core Team, 2018).

Mediante un test Chi-cuadrado, se analizó la posible influencia de la zona, año y estación del muestreo, así como el estadio de las garrapatas sobre la prevalencia de los distintos patógenos. Se realizó una Correlación de Spearman para constatar si existía alguna relación entre el número de total de garrapatas capturadas mensualmente y la prevalencia de los diferentes patógenos. Finalmente, mediante la realización de un Test de McNemar se comprobó si existían diferencias en la distribución de los resultados positivos y negativos obtenidos con los diferentes protocolos de PCR para la detección de *Rickettsia* spp. Además, para este patógeno, se analizó la concordancia entre pruebas mediante el cálculo del Coeficiente kappa de Cohen.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. GARRAPATAS IDENTIFICADAS Y DINÁMICA DE POBLACIONES

4.1.1. Especies de garrapatas identificadas

Durante los veinticuatro meses de muestreo se recogieron un total de 6.956 garrapatas. Mediante la utilización de las correspondientes claves morfológicas y tras la obtención de imágenes con estereomicroscopio y microscopio electrónico de barrido (MEB) se identificaron 5 especies de ixódidos, siendo la más abundante *I. ricinus* (99,25%), mientras que *D. marginatus* (0,27%), *D. reticulatus* (0,24%) e *I. frontalis* (0,22%) se hallaron en menor proporción. Además, se capturó un único ejemplar de *I. acuminatus* (0,01%).

Para confirmar la identificación de las especies de garrapatas encontradas se seleccionaron al menos dos individuos de cada especie y estadio disponibles, a excepción de *I. acuminatus* del que solo se disponía de un ejemplar, y se realizó la identificación molecular mediante el análisis de la secuencia de un fragmento del gen 16S ARNr de las garrapatas, que confirmó en todos los casos la identificación microscópica.

Ixodes ricinus, la garrapata más abundante, se encontró en las tres áreas de muestreo. Además, fue la única especie de la que se recogieron todos los estadios de desarrollo, ya que se obtuvieron un total de 652 larvas, 5.767 ninfas, 227 machos y 258 hembras. La identificación de esta especie se realizó en función de sus características morfológicas principales, como ser prostriata, mostrar un capítulo largo con córnua y aurículas en su base y presentar una larga espuela en la primera coxa (Figuras 4.1. y 4.2.).



Figura 4.1. Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de una hembra (arriba) y un macho (abajo) de *Ixodes ricinus*. En cada imagen, la mitad izquierda se obtuvo con MEB y la derecha con lupa

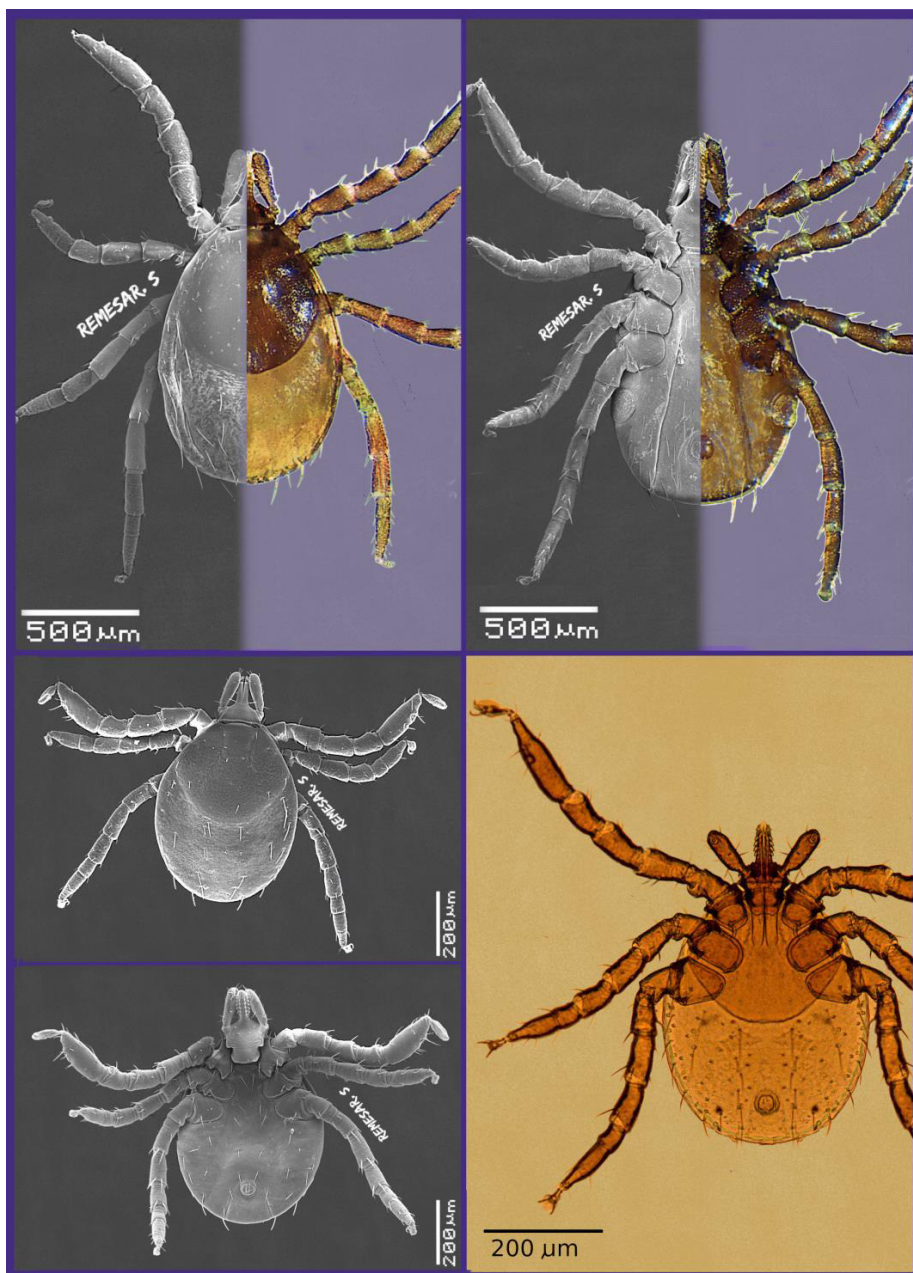


Figura 4.2. Ninfa (arriba) y larva (abajo) de *Ixodes ricinus*. Las imágenes de la ninfa incluyen una vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha), donde la mitad izquierda se obtuvo con MEB y la derecha con lupa. Las imágenes de la larva se obtuvieron con MEB (izq.) y microscopía óptica (dcha.)

Se obtuvieron 13 secuencias de *I. ricinus* a partir de 5 hembras, 5 machos y 3 ninfas; 7 fueron idénticas a la de un ejemplar de *I. ricinus* recogido en Bélgica (número de acceso KJ414456; Heylen *et al.*, no publicado); las 6 restantes mostraron una homología del 99% con las secuencias de *I. ricinus* JN248424, KF197126, KJ414456, KR870982 y KY319188, encontrándose de una a cinco mutaciones; estas nuevas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso MH645515 y MH645517 al MH645522.

El predominio de *I. ricinus* en Galicia coincide con datos previos obtenidos en el norte de España (García-SanMartín *et al.*, 2008; Barandika *et al.*, 2011; Espí *et al.*, 2017). Así mismo, en otros países del norte de Europa, *I. ricinus* es también la especie más frecuente (Estrada-Peña *et al.*, 2004). El predominio de *I. ricinus* en estas regiones está relacionado con los elevados niveles de humedad que requiere esta especie (Medlock *et al.*, 2013). Por el contrario, en otras regiones más secas del centro y sur de España son más frecuentes *R. bursa*, *R. sanguineus* s.l., *H. lusitanicum* y *D. marginatus* (Márquez, 2008; Fernández de Mera *et al.*, 2013; Requena-García *et al.*, 2017).

Se capturaron 14 ninfas y 1 larva de *I. frontalis*; aunque esta especie se considera exófila sus hospedadores preferentes son aves, encontrándose frecuentemente en sus nidos y en la vegetación adyacente, lo que hace difícil capturarla mediante bandereo (Schorn *et al.*, 2011; Heylen *et al.*, 2014). Posiblemente esto explique por qué solamente se recogieron estadios inmaduros, ya que son más abundantes que los adultos. Esta especie, al igual que *I. ricinus*, se encontró en todas las áreas de muestreo. Las características morfológicas más importantes para su identificación fueron la presencia de setas largas así como de espuelas laterales externas en todas las coxas (Figura 4.3.). Además, la espuela interna de la coxa 1 es más corta que en *I. ricinus*.

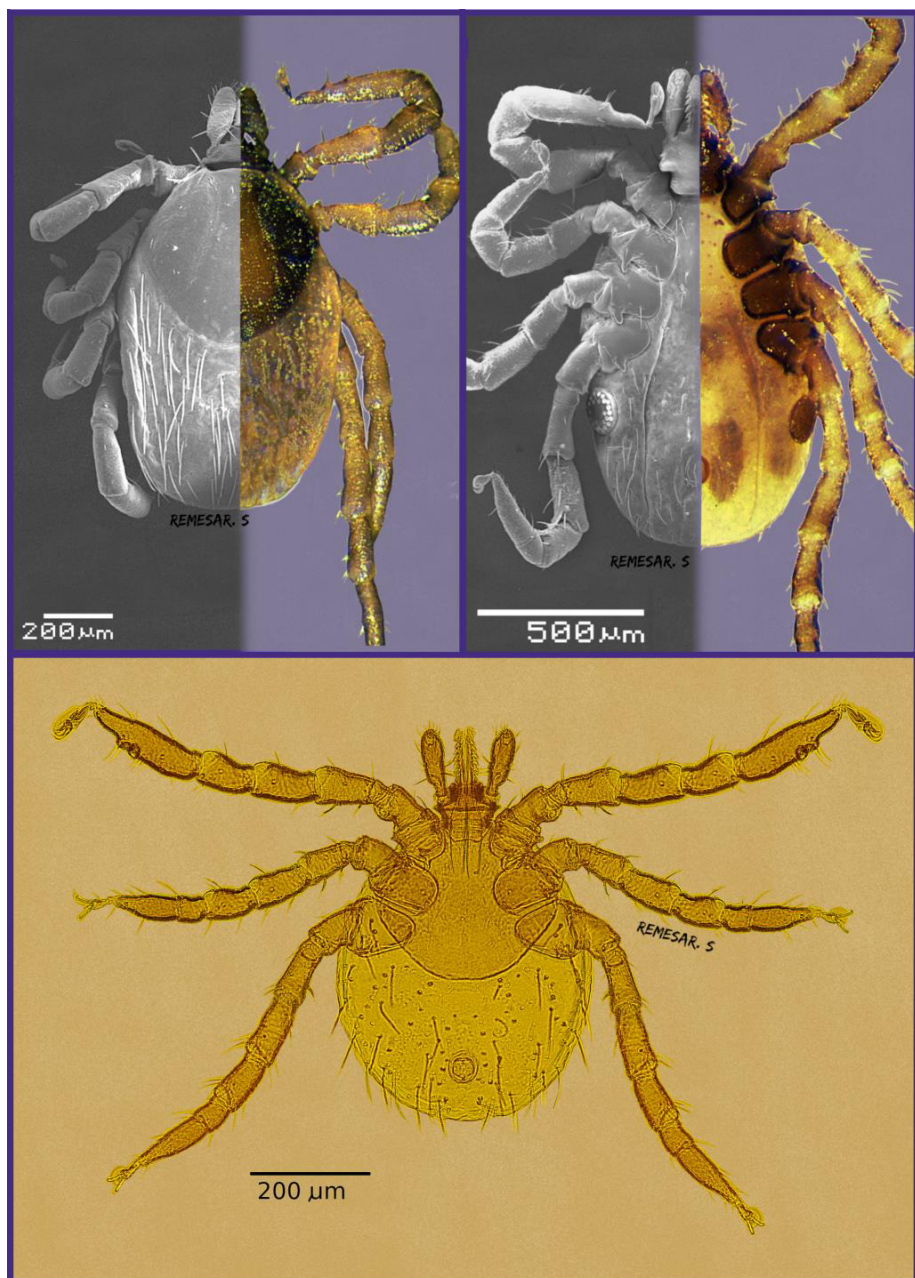


Figura 4.3. Ninfas (arriba) y larva (abajo) de *Ixodes frontalis*. Se incluye una vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de la ninfa, donde la mitad izquierda se obtuvo con MEB y la derecha con lupa. La imagen de la larva se obtuvo con microscopía óptica

En este caso sólo se analizaron molecularmente dos ejemplares, y las secuencias obtenidas presentaron una similitud del 99-100% con una secuencia de *I. frontalis* procedente de Bélgica (KJ414454; Heylen *et al.*, no publicado). Uno de los aislados mostró una única mutación con respecto a KJ414454, y por ello su secuencia se depositó en el GenBank con el número de acceso MH645516.

El hallazgo de un macho de *I. acuminatus* se puede considerar accidental, pues se ha señalado que es una especie endófila (Pérez-Eid, 2007), aunque puede capturarse mediante bandereo de forma ocasional (Petney *et al.*, 2012). Este espécimen pudo identificarse por la presencia de una espuela interna corta en la coxa 1 y porque los dentículos externos del hipostoma son más pequeños que en los machos de *I. ricinus* (Figura 4.4.).



Figura 4.4. Vista dorsal (izq.) y ventral (dcha.) de un macho de *Ixodes acuminatus* obtenidas mediante lupa

Al comparar la secuencia de esta garrapata con las depositadas en el GenBank, la más similar correspondió a un único ejemplar de *I. ricinus* (JN248424), mostrando 5 polimorfismos (99%); sin embargo, esta secuencia mostraba más de 40 polimorfismos de un solo nucleótido con el resto de secuencias depositadas como *I. ricinus* en la

misma base de datos, y por este motivo se consideró que estaba incorrectamente identificada. Además, tras la JN248424, la siguiente secuencia más parecida correspondía a *Ixodes laguri* (KR870981) con una similitud del 95% al presentar diferencias en 22 pares de bases. La secuencia obtenida fue depositada en el GenBank como *I. acuminatus* con el número de acceso MH645515.

Respecto al género *Dermacentor*, únicamente se obtuvieron adultos de *D. marginatus* y *D. reticulatus*, lo que puede deberse a que tanto las ninfas como las larvas de estas especies presentan un comportamiento endófilo. Se recogieron 15 hembras y 4 machos de *D. marginatus* y 10 hembras y 7 machos de *D. reticulatus*. Estas garrapatas se caracterizan por ser metastriata, tener un escudo ornamentado, presentar ojos, 2 espuelas largas en la primera coxa y un capítulo corto. La diferenciación entre estas dos especies se logró mediante la observación de la espuela presente en el palpoartículo dos de *D. reticulatus*; las hembras de esta especie también presentan áreas porosas redondeadas y una apertura genital en forma de “U”, que facilitan su identificación (Figura 4.5. y 4.6.).

Se seleccionaron cuatro individuos (dos hembras y dos machos) de cada una de las especies de *Dermacentor*, que se caracterizaron molecularmente. De las 4 secuencias de *D. marginatus*, una fue idéntica a KR870968, obtenida a partir de un ejemplar de esta especie recogido en Turquía (Orkun, 2018), mientras que las tres restantes presentaron una similitud del 99% al mostrar mutaciones en un sólo nucleótido; estas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso MH645512 y MH645513. Todas las secuencias obtenidas para *D. reticulatus* fueron idénticas entre sí, mostrando una homología del 99% con una secuencia de esta especie procedente de Turquía (KR870969; Orkun, 2018) debido a una única mutación. La secuencia obtenida se depositó con el número de acceso MH645514.



Figura 4.5. Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de una hembra (arriba) y una macho (abajo) de *D. marginatus*. En cada imagen, la mitad izquierda se obtuvo con MEB y la derecha con lupa

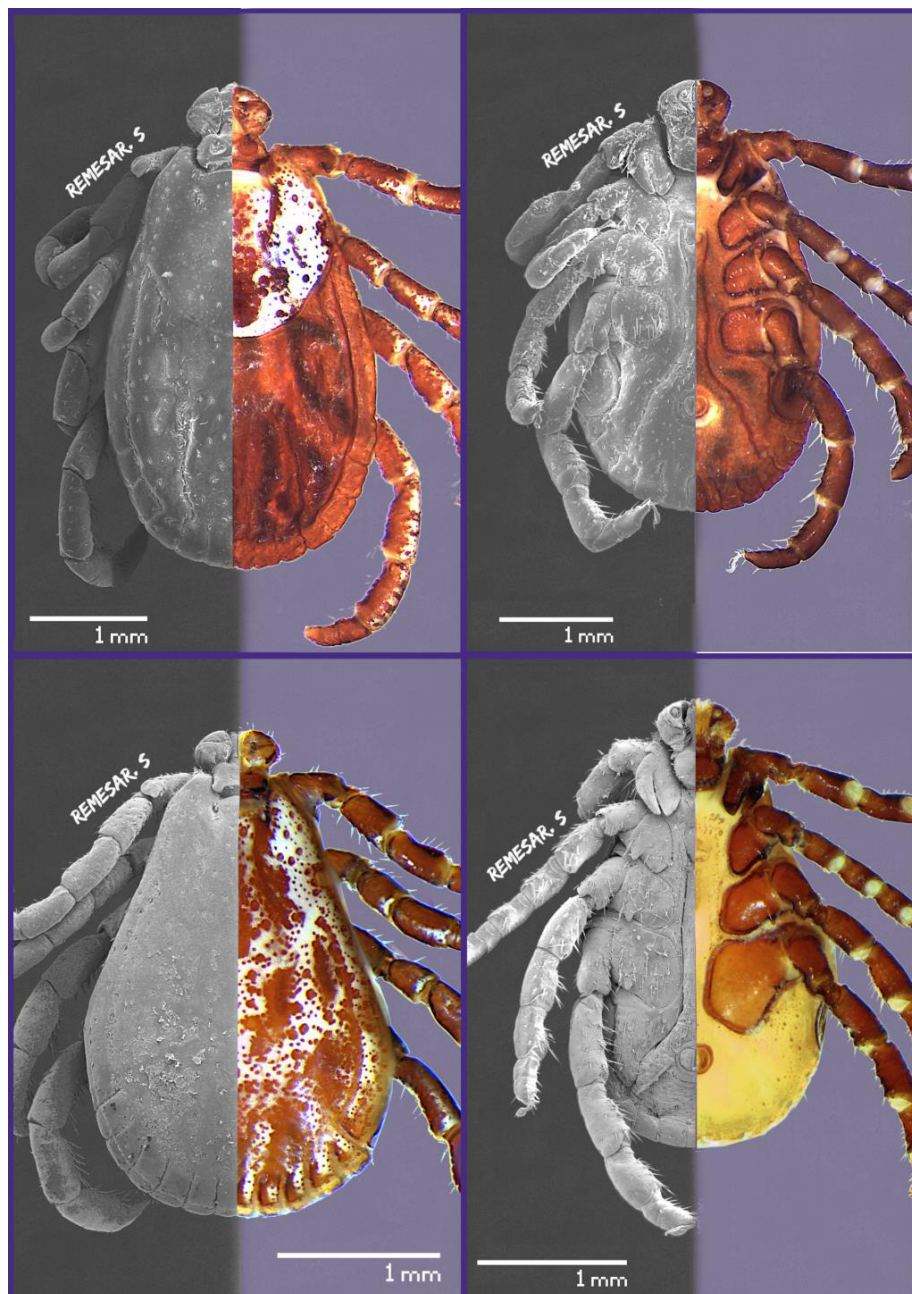


Figura 4.6. Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de una hembra (arriba) y una macho (abajo) de *D. reticulatus*. En cada imagen, la mitad izquierda se obtuvo con MEB y la derecha con lupa

Solamente se encontraron garrapatas *D. marginatus* en las zonas de costa y de montaña, mientras que todos los ejemplares de *D. reticulatus* se hallaron en la meseta. Aunque se trate de dos especies de garrapatas pertenecientes al mismo género, se ha demostrado que muestran una distribución diferente. En España, *D. marginatus* presenta una distribución más amplia (Márquez, 2008; Toledo *et al.*, 2009; Fernández de Mera *et al.*, 2013; Requena-García, 2017) siendo especialmente abundante en zonas más secas y donde predomina una vegetación arbustiva (Estrada-Peña *et al.*, 2004). Por el contrario, *D. reticulatus* necesita mayor humedad ambiental, de manera que es más abundante en el norte de Europa, con una distribución que se extiende hasta el norte de España (Estrada-Peña *et al.*, 2004; García-SanMartín, 2008; Barandika *et al.*, 2011; Espí *et al.*, 2017).

La información acerca de las especies de garrapatas encontradas en la zona de estudio tiene un gran interés epidemiológico, pues estos artrópodos pueden actuar como vectores o reservorios de diversos agentes patógenos. El hecho de que *I. ricinus* sea la garrapata predominante puede suponer un elevado riesgo de transmisión de importantes patógenos a las personas, pues se considera el principal vector de *Borrelia burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* y del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Pérez *et al.*, 2012). Además, su importancia vectorial se hace todavía más evidente al haberse detectado previamente *B. burgdorferi* s.l. en garrapatas de la zona de estudio (Díaz *et al.*, 2017) donde también se ha observado un aumento del número pacientes infectados con esta espiroqueta en los últimos años (Vázquez-López *et al.*, 2015). Así mismo, las garrapatas del género *Dermacentor* pueden actuar como vectores y/o reservorios de algunas especies de *Rickettsia* (Masala *et al.*, 2012), presentando, por lo general, prevalencias muy elevadas (Toledo *et al.*, 2009; Barandika *et al.*, 2010; Milhano *et al.*, 2010; Radulovic *et al.*, 2011; Reye *et al.*, 2013; May y Strube, 2014; Castro *et al.*, 2015; Zajac *et al.*, 2017).

En nuestro estudio, la diversidad de especies de garrapatas detectadas puede considerarse reducida pues en el norte de España otros autores han detectado, también mediante bandereo, la presencia

de otras especies como *R. bursa*, *H. concinna*, *H. punctata* y *H. inermis*, que no se recogieron en este estudio (García-SanMartín, 2008; Barandika *et al.*, 2011; Espí *et al.*, 2017). Esto puede deberse a que, aunque las características climáticas de las zonas de estudio son diferentes, la vegetación y los hospedadores presentes son similares. En todos los casos se muestrearon caminos existentes en zonas de monte con predominio de robles, castaños y otra vegetación autóctona, por lo que es posible que otras especies de garrapatas pudieran aparecer en otros hábitats como praderas, zonas mayoritariamente arbustivas, zonas rocosas con menor humedad ambiental, parques públicos o zonas verdes urbanas, entre otras. Además todas las zonas de muestreo, a pesar de presentar características climáticas distintas, se encuentran dentro de un área de menos de 10.000 km², por lo que sería interesante comprobar qué especies de garrapatas están presentes en otras zonas de Galicia, como la costa Atlántica, zonas más céntricas de la Comunidad Autónoma o en la zona sur.

4.1.2. Dinámica de las poblaciones de *I. ricinus*

El estudio de la dinámica de las poblaciones de garrapatas se realizó únicamente en *I. ricinus* debido a que fue la especie más abundante, hallándose todos sus estadios en todas las áreas de muestreo. Además, como se puede apreciar en la Tabla 4.1., el número de ejemplares capturados de las otras especies fue tan reducido que no resultó representativo, impidiendo analizar estadísticamente sus poblaciones con una potencia suficiente.

Se recogieron ejemplares de *I. ricinus* de forma mensual durante los dos años del estudio y en las tres zonas, excepto los muestreos realizados en la zona de montaña durante marzo del 2016 y enero del 2017.

Tabla 4.1. Número de garrapatas capturadas al considerar la especie, estadio, zona y año de muestreo

	Zonas de muestreo			Año	
	Meseta	Montaña	Costa	2016	2017
<i>I. acuminatus</i>					
Machos	0	0	1	0	1
<i>I. frontalis</i>					
Larvas	0	0	1	0	1
Ninfas	10	2	2	5	9
TOTAL	10	2	3	5	10
<i>I. ricinus</i>					
Larvas	143	64	445	297	355
Ninfas	747	1.368	3.652	2.868	2.899
Machos	33	114	80	108	119
Hembras	53	126	79	143	115
TOTAL	976	1.672	4.256	3.416	3.488
<i>D. marginatus</i>					
Machos	0	1	3	3	1
Hembras	0	15	0	11	4
TOTAL	0	16	3	14	5
<i>D. reticulatus</i>					
Machos	7	0	0	5	2
Hembras	10	0	0	7	3
TOTAL	17	0	0	12	5
TOTAL	1.003	1.690	4.263	3.447	3.509

Respecto a la distribución de *I. ricinus*, durante ambos años de estudio se observó que el número de ejemplares aumentaba a finales de primavera y principios de verano (Figura 4.7.), especialmente en el mes de mayo, cuando se capturaron entre el 20% y el 39% de todas las garrapatas de ese año, independientemente del estadio y la zona de muestreo. Por el contrario, el número de ninfas y adultos disminuyó durante el verano, encontrándose, por lo general, el menor número de ejemplares a finales de otoño y principios de invierno. En algunos periodos se observó un doble pico o pico bimodal, donde el número de ejemplares de *I. ricinus* aumentaba en un mes determinado y disminuía en el muestreo posterior, para volver a incrementarse al mes siguiente.

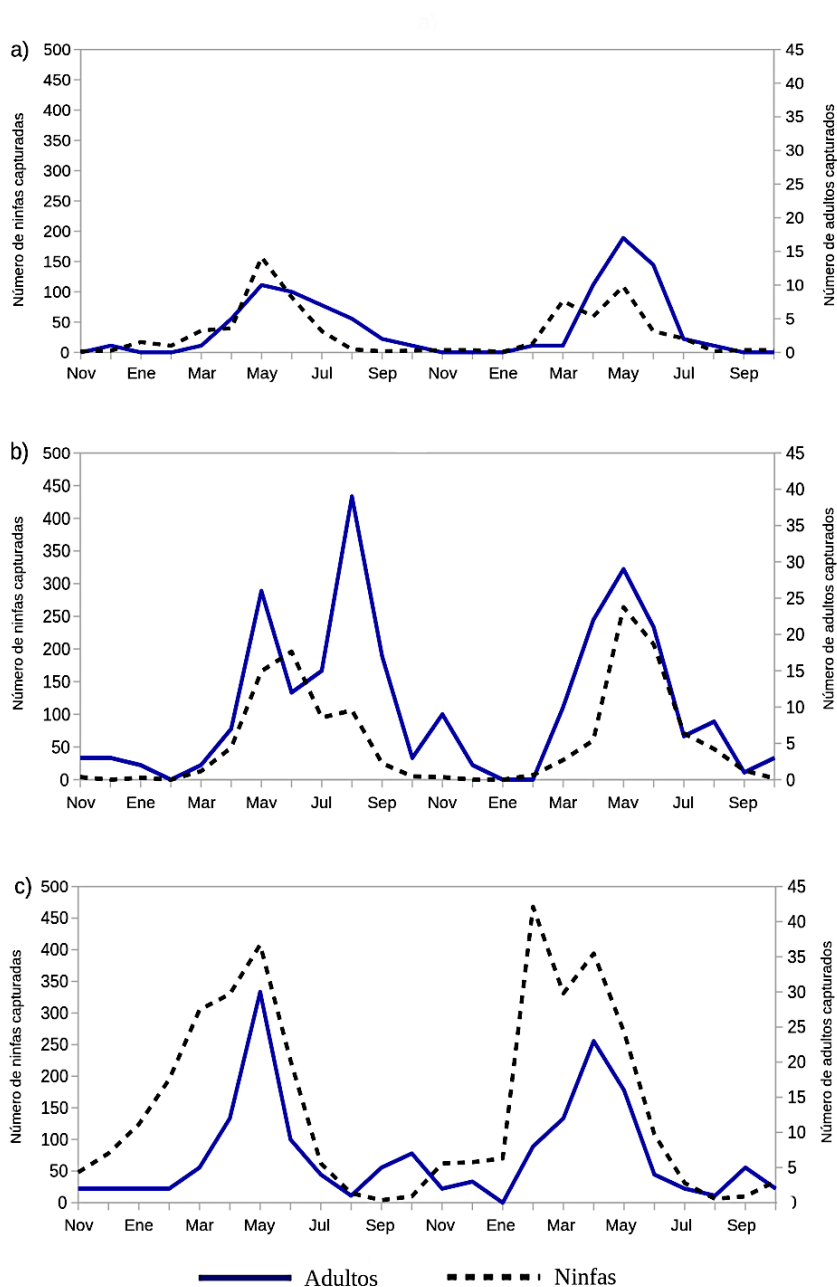


Figura 4.7. Dinámica de las poblaciones de ninfas y adultos de *I. ricinus* en: (a) meseta, (b) montaña, (c) costa

De hecho, durante el año 2016, tanto las ninfas como los adultos recogidos en la montaña presentaron un primer pico en mayo-junio y un segundo pico en agosto. En el siguiente año (2017), las ninfas capturadas en la meseta mostraron un primer pico en marzo y un segundo pico en mayo, mientras que las ninfas capturadas en la costa mostraron un comportamiento similar en los meses de febrero y abril. Este fenómeno se ha observado en países europeos que presentan estaciones con marcadas variaciones climáticas, caracterizadas principalmente por inviernos con temperaturas muy bajas; en estas zonas, las poblaciones de *I. ricinus* muestran dos picos, uno a principios de primavera y otro en otoño (Kurtenbach *et al.*, 2006; Cayol *et al.*, 2017). Aunque en la montaña y en la costa se observan dos pequeños picos a finales de verano y a principios de otoño, que podrían coincidir con los descritos por estos autores, éstos no son marcados, ni se observan durante los dos años de estudio ni en todas las áreas de muestreo, sino que aparecen aleatoriamente, por lo que probablemente se trate de un hallazgo casual.

4.1.3. Influencia de los parámetros climáticos en las poblaciones de *I. ricinus*

Se realizó un análisis multivariante empleando un modelo lineal generalizado mixto (MLGM) que incluía todos los parámetros climáticos estudiados, así como el número de ninfas y adultos de *I. ricinus* capturados en cada uno de los muestreos, que permitió valorar los factores que presentaban un efecto más marcado sobre la fenología de las poblaciones de estas garrapatas. Las larvas no se incluyeron en el análisis ya que éstas presentaron una distribución desigual a lo largo del año, por lo que los resultados obtenidos mediante este tipo de análisis no serían fiables.

La aplicación de este análisis permitió constatar que la fenología de las poblaciones de garrapatas *I. ricinus*, tanto de las ninfas como de los adultos, estaba relacionada fundamentalmente con la temperatura acumulada, el fotoperiodo, la temperatura máxima media y la humedad relativa máxima media, siendo la temperatura acumulada el

factor con una mayor influencia sobre las poblaciones de esta especie de garrapata. De este modo, el aumento de la temperatura acumulada, de la temperatura máxima media y del fotoperiodo tuvo un efecto positivo sobre las poblaciones de garrapatas, puesto que se relacionó con un incremento en el número de ejemplares recogidos. Por el contrario, el aumento de la humedad relativa máxima media se asoció con una disminución del número de garrapatas en la vegetación. Los resultados del MLGM se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Modelos lineales obtenidos para los adultos y ninfas de *I. ricinus*

	Estimador	EE	GL	Valor T	P
Modelo obtenido para los adultos de <i>I. ricinus</i>					
(Intercept)	0,031	0,160	43,420	0,196	0,845
T ^a acumulada	0,671	0,038	37,110	17,834	<0,001
Fotoperiodo	0,000	0,000	32,480	5,616	<0,001
T ^a máxima media	0,011	0,002	46,480	4,764	<0,001
H ^{dad} relativa máx.	-0,005	0,002	45,630	-3,100	0,003
Modelo obtenido para las ninfas de <i>I. ricinus</i>					
(Intercept)	-0,174	0,173	64,540	-1,008	0,317
T ^a acumulada	0,651	0,046	43,770	14,053	<0,001
Fotoperiodo	0,001	0,000	35,050	6,535	<0,001
T ^a máxima	0,010	0,003	66,560	4,095	0,000
H ^{dad} relativa máx.	-0,004	0,002	66,100	-2,300	0,025

Los resultados del MLGM coinciden con los obtenidos por otros autores que comprobaron que los valores extremos de temperatura y humedad afectan a la supervivencia y desarrollo de *I. ricinus*, limitando su extensión geográfica (Gray 2008; Alonso-Carné *et al.*, 2016). Cuando una garrapata se encuentra en lo alto de la vegetación a la espera de un hospedador, ésta queda expuesta a las condiciones ambientales, de manera que cuando la humedad ambiental es reducida necesitará descender a las capas más bajas de la vegetación, donde la humedad relativa es mayor, para adquirir agua del ambiente, por lo que en ese momento no podría recogerse mediante bandereo (Rudolph y Knülle, 1974). Se considera que el inicio de la actividad de las ninfas y de los adultos de *I. ricinus* tiene lugar preferentemente cuando la media de la temperatura máxima diaria se aproxima a 7 °C,

mientras que las larvas necesitan una temperatura cercana a 10 °C. Además, la temperatura acumulada tiene un efecto positivo sobre el desarrollo de los huevos de *I. ricinus* (Gray, 2008); por ello puede emplearse para predecir la eclosión de una gran cantidad de huevos en un determinado momento y, en consecuencia, el incremento del número de larvas en la vegetación (Alonso-Carné *et al.*, 2016).

El aumento del número de horas de luz suele estar relacionado con un mayor número de hospedadores disponibles para las garrapatas, facilitando que completen el ciclo y, por tanto, impidiendo que entren en diapausa. Además, los ixódidos muestran fototropismo positivo, de modo que el aumento de horas de luz se relaciona con una mayor actividad de búsqueda de hospedador, lo que facilita su captura mediante bandereo (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Gray *et al.*, 2016).

Nuestros resultados también mostraron que la densidad de las ninfas y adultos de *I. ricinus* se incrementaba con la temperatura máxima media y disminuía cuando aumentaba la humedad relativa máxima media. Esto puede deberse a que en invierno se recogió el número de garrapatas más bajo, coincidiendo con la época donde la temperatura máxima alcanza su valor más bajo y la humedad relativa máxima su valor más alto. Algunos autores (Estrada-Peña *et al.*, 2004) indicaron que los valores extremos tanto de temperatura como de humedad pueden afectar negativamente al desarrollo de las poblaciones de garrapatas; sin embargo, en nuestro estudio la temperatura máxima nunca llegó a ser lo suficientemente elevada como para producir un efecto negativo sobre las poblaciones de garrapatas y, por el contrario, los valores de humedad relativa máxima con frecuencia llegaron al 99%.

Algunos factores estudiados como el “*Normalized Difference Vegetation Index*” (NDVI), el déficit de saturación, la humedad relativa y la temperatura media no afectaron de forma significativa a las poblaciones de *I. ricinus*. En este sentido, Bisanzio *et al.* (2008) sugirieron que el NDVI no era una variable adecuada para predecir la actividad de *I. ricinus*; sin embargo otras variables como la humedad relativa y la temperatura media sí se identificaron como factores que

afectan a las poblaciones de esta garrapata (Perret *et al.*, 2000; Randolph *et al.*, 2002; Estrada-Peña *et al.*, 2004).

Muchos estudios incluyen el déficit de saturación entre las variables estudiadas ya que es una fórmula que integra la temperatura y la humedad relativa. Como se ha comentado anteriormente, la humedad relativa afecta al comportamiento de las garrapatas, sin embargo, los niveles de humedad presentes en las zonas estudiadas fueron siempre muy elevados, encontrándose durante casi todo el año por encima del 85%, límite por debajo del cual *I. ricinus* no puede absorber agua del ambiente y tiene que descender a capas más profundas de la vegetación para hacerlo (Kahl y Knülle, 1988). Que en este trabajo los niveles de humedad relativa media se encontrasen siempre por encima de ese límite explicaría por qué esta variable no influyó en el comportamiento de las garrapatas.

Finalmente, hay que tener en cuenta que el efecto que una variable ejerce sobre las poblaciones de garrapatas puede variar en función de la zona de estudio. Como se indicó en la sección 1.1.5. de los Antecedentes, los efectos producidos por el fotoperiodo y la temperatura sobre las poblaciones de garrapatas son mayores en las regiones donde el número de horas de luz diarias y la temperatura varían mucho de unas estaciones a otras; por el contrario, en las zonas tropicales parece que el efecto de estas variables sobre las poblaciones de garrapatas es menor (Estrada-Peña, 2015).

4.2. DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN LAS GARRAPATAS

4.2.1. *Anaplasma* spp.

4.2.1.1. Prevalencia y especies.

Mediante la realización de una qPCR comercial para la detección todas las especies de *Anaplasma*, se detectó una prevalencia total del 0,66% (7/1.056) en *I. ricinus* y del 8,33% en *I. frontalis* (1/12). No se halló ADN de esta bacteria en el resto de especies analizadas. Tras la realización de tres PCRs convencionales que amplifican parcialmente los genes que codifican para el *groESL*, el 16S *ARNr* y el *msp2*, se confirmó la presencia de *Anaplasma* spp. en las 8 muestras positivas a la qPCR. El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar la especie implicada, observándose que todos los aislados correspondían a *A. phagocytophilum*, presentando una homología que osciló entre el 99 y el 100% con respecto a diferentes secuencias de esta bacteria recogidas en la Tabla 4.3.

Aquellas secuencias que presentaban mutaciones con respecto a las secuencias de referencia se depositaron en el GenBank con los números de acceso MK341070-MK341072 para el gen *groESL*; MK341073 para el *msp2* y MK341074-MK341076 para el 16S *ARNr*.

La prevalencia de *A. phagocytophilum* en *I. ricinus* fue baja y similar a la encontrada en otros países como Hungría, Eslovenia y Países Bajos, donde osciló entre el 0,1 % y el 0,6% (Wielinga *et al.*, 2006; Smrdel *et al.*, 2010; Egyed *et al.*, 2012). Por el contrario, en la mayoría de países europeos se hallaron prevalencias más elevadas, entre el 1,6% y el 23,6% (Sixl *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Skarphedinsson *et al.*, 2007; Movila *et al.*, 2009; Wójcik-Fatla *et al.*, 2009; Reye *et al.*, 2010; Severinsson *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2011; Lempereur *et al.*, 2012; Lommano *et al.*, 2012; Paulauskas *et al.*, 2012; Subramanian *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2013; Reye *et al.*, 2013; Soleng y Kjelland, 2013; Tomanovic *et al.*, 2013; May y Strube, 2014; Venclikova *et al.*, 2014; Sormunen *et al.*, 2016; Schotta *et al.*, 2017).

Tabla 4.3. Garrapatas positivas a *Anaplasma phagocytophilum*, número de acceso de la secuencia de referencia y porcentaje de homología con respecto a la misma

Garrapatas	groESL		16S ARNr		msp2		
	Nº de acceso	Homología (%)	Nº de acceso	Homología (%)	Nº de acceso	Homología (%)	
<i>I. ricinus</i>	1 H (GV036)	KJ832450	1.153/1.153 (100%)	KY404195	509/509 (100%)	KX591651	299/299 (100%)
	1 N (GV320)	KF031393	1.119/1.119 (100%)	KP276588	541/543 (99,6%)	JQ669948	295/295 (100%)
	1 M (GV348)	AF548385	1.170/1.171 (99,9%)	EU839847	511/511 (100%)	CP006617	293/293 (100%)
	1 H (GV450)	KC800984	891/892 (99,9%)	KC800983	547/547 (100%)	KX591651	296/296 (100%)
	1 N (GV566)	AY220468	1.171/1.171 (100%)	KC800983	546/546 (100%)	KX591651	269/269 (100%)
	1 N (GV567)	AY220468	1.160/1.161 (99,9%)	JN181070	545/545 (100%)	KX591651	301/301 (100%)
	1 N (GV898)	EU552912	1.113/1.113 (100%)	KY404198	536/537 (99,8%)	CP015376	335/335 (100%)
<i>I. frontalis</i>	1 N (GV1104)	KF031393	1.119/1.119 (100%)	KP276588	540/542 (99,6%)	JQ669948	303/305 (99,3%)

N: ninfa; H: hembra; M: macho

Aunque el número de investigaciones sobre la presencia de *Anaplasma* spp. en garrapatas de vegetación en el norte España no es muy elevado, las prevalencias encontradas en *I. ricinus* son superiores a las observadas en este estudio, pues se sitúan entre el 2% y el 20,5% (Barandika *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2011; Ruiz-Fons *et al.*, 2012), cifra similar (13,48%) a la hallada en *I. ricinus* procedentes de ciervos (*Cervus elaphus*) de La Rioja (Portillo *et al.*, 2011). Sin embargo, Ruiz-Fons *et al.* (2012) observaron notables variaciones en la prevalencia de *A. phagocytophilum* en *I. ricinus* de Asturias, pues en función del área de estudio ésta osciló entre el 2 y el 32,7%, indicando que estas diferencias podrían estar relacionadas con las poblaciones de reservorios presentes en cada zona.

Los escasos estudios sobre la prevalencia de *Anaplasma* spp. en *I. frontalis* se caracterizan por un reducido número de garrapatas analizadas, recogidas directamente de aves o de sus nidos. A pesar de que en nuestro estudio se procesaron muy pocos ejemplares de *I. frontalis*, la prevalencia de *Anaplasma* spp. fue superior a la señalada para *A. bovis* (2,30%) y *A. phagocytophilum* (3,57%) en esta garrapata (Palomar *et al.*, 2015; Heylen *et al.*, 2017).

Aunque *I. ricinus* es el principal vector de *A. phagocytophilum*, este patógeno se ha detectado previamente en garrapatas del género *Dermacentor* (Silaghi *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2013). Se ha demostrado que *D. reticulatus* puede actuar como vector de *A. marginale* (Estrada-Peña *et al.*, 2017) y tanto *A. phagocytophilum* como *A. marginale* se han identificado en *D. marginatus* (Toledo *et al.*, 2009; Bonnet *et al.*, 2013), aunque su capacidad vectorial todavía se desconoce (Silaghi *et al.*, 2012). Con respecto a *I. acuminatus*, aunque se cree que esta garrapata puede participar en el ciclo endofílico de ciertos patógenos como *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *C. burnetii*, *F. tularensis* y *R. helvetica* (Szekeres *et al.* 2015), su papel como vector de estos patógenos no se ha demostrado aún (Estrada-Peña *et al.*, 2017) y hasta la fecha no se ha relacionado con el ciclo de *A. phagocytophilum*.

4.2.1.2. Dinámica de infección

En el caso concreto de este patógeno no fue posible realizar el estudio de la dinámica de infección con una potencia suficiente ya que el número de garrapatas positivas fue muy reducido.

Al considerar el estadio de desarrollo de *I. ricinus* (Tabla 4.4.) se observó que la prevalencia fue similar en ninfas (0,61%) y adultos (0,74%), por lo que las diferencias no fueron significativas ($\chi^2=0,4390$; $p>0,05$). Estos resultados coinciden parcialmente con los señalados por diversos autores (Christova *et al.*, 2001; Bown *et al.*, 2009; Severinsson *et al.*, 2010; Lommano *et al.*, 2012; Soleng y Kjelland, 2013; Venclikova *et al.*, 2014; Sormunen *et al.*, 2016) quienes observaron prevalencias superiores, aunque no significativas,

en adultos. Esto podría deberse a que *Anaplasma* spp. solamente se transmite de forma transestadial en la garrapata, por lo que la prevalencia en adultos será mayor que en ninfas al tener más probabilidades de alimentarse de un hospedador infectado (Rizzoli *et al.*, 2014). Por el contrario, Lommano *et al.* (2012) y May y Strube (2014) encontraron prevalencias superiores en ninfas; según estos autores, esto podría observarse cuando la población de hospedadores de los que se alimentan las ninfas para mudar a adultos presenta una menor prevalencia de *Anaplasma* spp. que aquella de la que se alimentan las larvas para mudar a ninfas.

Tabla 4.4. Prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* en *I. ricinus* al considerar el estadio de desarrollo, año, estación y zona de muestreo

		Positivos/total	Porcentaje
Estadio	Ninfas	4/652	0,61%
	Hembras	2/202	0,99%
	Machos	1/202	0,50%
Año de muestreo	Año 1	4/534	0,75%
	Año 2	3/522	0,57%
Estación de muestreo	Primavera	3/437	0,69%
	Verano	1/259	0,39%
	Otoño	2/148	1,35%
	Invierno	1/212	0,47%
	Meseta	1/272	0,37%
Zona de muestreo	Montaña	4/372	1,08%
	Costa	2/412	0,49%
TOTAL		7/1.056	0,66%

La prevalencia de infección fue prácticamente idéntica al considerar el año y la estación de realización del muestreo (Tabla 4.4.). Aunque se encontraron garrapatas positivas a esta bacteria en todas las estaciones del año, la prevalencia fue ligeramente mayor en otoño, pero no existieron diferencias significativas en ninguno de los casos ($p > 0,05$). En el País Vasco, Barandika *et al.* (2008) tampoco hallaron diferencias significativas en la prevalencia de *A. phagocytophilum* en *I. ricinus* procedentes de la vegetación, aunque

observaron que el porcentaje de garrapatas positivas era mayor en verano (4,5%) que en invierno (1,5%).

Respecto a la posible influencia de las áreas de muestreo (Tabla 4.4.), se encontraron garrapatas positivas en todas las zonas, no encontrando diferencias significativas ($\chi^2 = 1,5180$; $p > 0,05$).

4.2.1.3. Caracterización de cepas

Como se indicó en el apartado 1.2.1. de los Antecedentes, *A. phagocytophilum* puede infectar a una amplia variedad de hospedadores, aunque las diferentes cepas presentan preferencia por uno o varios hospedadores (Bown *et al.*, 2009; Battilani *et al.*, 2017). Con la finalidad de conocer si alguno de los aislados de *A. phagocytophilum* obtenidos en este estudio poseían potencial zoonótico, se analizaron las secuencias de los genes que codifican para el *groESL* y el 16S *ARNr*. Además, las secuencias obtenidas para ambos genes se seleccionaron, junto con varias secuencias de referencia obtenidas del Genbank, para realizar dos árboles filogenéticos.

En el árbol filogenético basado en el estudio del gen *groESL* (Figura 4.8.) se aprecian claramente dos clados que corresponden a las estirpes I y II de *A. phagocytophilum* (Katargina *et al.*, 2012; Baráková *et al.*, 2014). El primer clado engloba cepas de América y Europa procedentes de *I. ricinus* y numerosos mamíferos y aves, muchas de ellas consideradas patógenas para el hombre y ciertos animales como caballos, perros u ovejas (Katargina *et al.*, 2012; Baráková *et al.*, 2014). En el segundo clado se incluyen cepas de *A. phagocytophilum* procedentes de Europa que, en principio, carecen de potencial zoonótico. De este modo, el árbol muestra que tres aislados, GV320, GV348 y GV1104, se incluyen dentro del clado I, y por lo tanto, podrían ser patógenas para personas y animales.

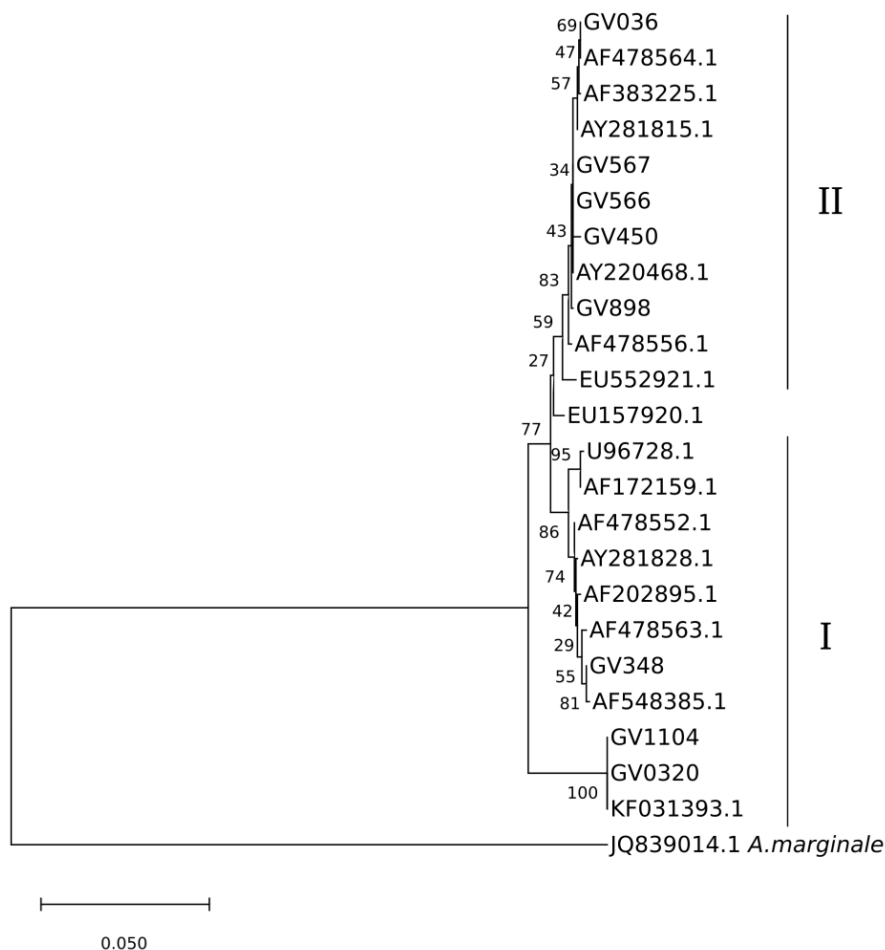


Figura 4.8. Árbol filogenético obtenido mediante la secuencia el gen *groESL* de *A. phagocytophilum*. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

El árbol filogenético obtenido para el gen 16S *ARNr* (Figura 4.9.) muestra varios clados; sin embargo los valores de “bootstrap” son bajos (menores al 70-75%), por lo que las divisiones no son tan claras como las obtenidas para el *groESL*. Para el gen 16S *ARNr* de *A. phagocytophilum* se han descrito diferentes variantes, cuyo número

varía dependiendo del estudio, alcanzando hasta 7 (Paulauskas *et al.*, 2012); cada variante incluye cepas relacionadas con uno o varios grupos de vertebrados. De este modo, las variantes 1, 2 y 3 se han detectado en garrapatas procedentes de la vegetación, así como en perros, gatos, cérvidos, vacas e incluso humanos, todos ellos procedentes de Europa. Por el contrario, las variantes 4, 5 y 6 proceden tanto de Europa como de América, encontrándose también en diversas especies de animales. Las cepas que se consideran patógenas para las personas se incluyen dentro de las variantes 1, 4 y 5 (Katargina *et al.*, 2012; Paulauskas *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016). Otros autores han realizado otra clasificación para este gen, incluyendo diferentes variantes como la “A”, “B”, “D”, “T”, “N”, “O”, “P”, “S”, “V”, “W”, “X”, “Y”, “Z”, siendo las dos primeras las que se relacionan con la aparición de la enfermedad en humanos (Overzier *et al.*, 2013). La variante “W” se ha detectado en diversas especies de animales como corzos, muflones, roedores, vacas, erizos, cabras, etc. e incluso en humanos (Overzier *et al.*, 2013), mientras que las variantes “X” e “Y” se han identificado en ungulados (Overzier *et al.*, 2013).

Además, se ha señalado que las cepas patógenas para humanos presentan, en determinadas posiciones de la secuencia de ambos genes, una serie de nucleótidos que se mantienen constantes (Sumner *et al.*, 1997; Petrovec *et al.*, 2002). En el gen *groEL* es especialmente importante la presencia de una timina en la posición 724, que se corresponde con la transcripción de una serina. Las cepas no patógenas suelen presentar una guanina en esa posición, lo que produce un cambio en el aminoácido codificado, en este caso por una alanina. Por ello, varios autores consideran que la presencia de una timina en esa posición es un indicador de la patogenicidad de *A. phagocytophilum* para el ser humano y los animales, ya que la mayoría de cepas identificadas como patógenas la presentan (Petrovec *et al.*, 2002; Carpi *et al.*, 2009; Katargina *et al.*, 2012).

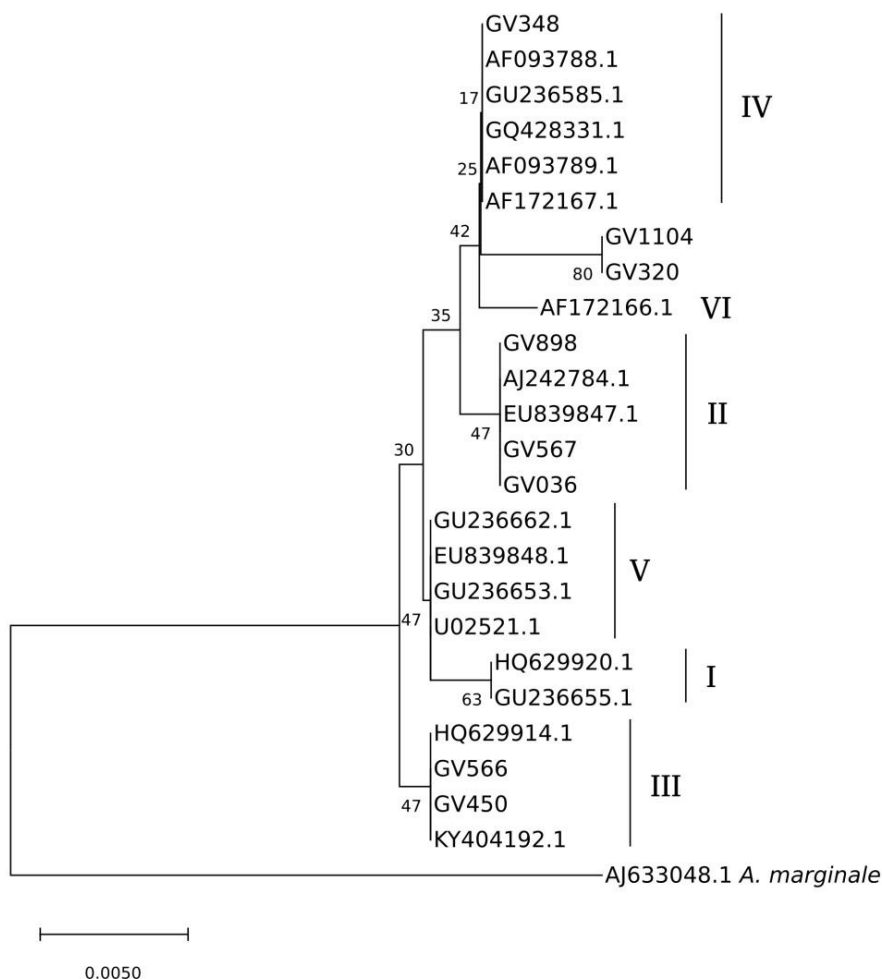


Figura 4.9. Árbol filogenético obtenido mediante la secuencia el gen 16S *ARNr* de *A. phagocytophilum*. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

En las secuencias obtenidas para el gen *groEL* (Tabla 4.5.) se encontraron hasta 56 polimorfismos con respecto a la secuencia U96728, correspondiente a la cepa asociada a anaplasmosis humana (Sumner *et al.*, 1997). Sin embargo, solo uno de estos 56 polimorfismos dio lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos, que correspondió a la citada transversión GxT en la posición 724 y

que modifica el aminoácido codificado de serina a alanina (Petrovec *et al.*, 2002; Carpi *et al.*, 2009; Katargina *et al.*, 2012). De todos los aislados positivos, solo uno no presentó dicha mutación, la GV348, por lo que su secuencia de aminoácidos fue idéntica a la de la cepa patógena. De hecho, el árbol filogenético obtenido mediante el estudio del gen *groESL* mostraba su pertenencia al clado I, donde se encuentran cepas que podrían poseer potencial patógeno para el ser humano y ciertos animales. Por el contrario, las muestras GV320 y GV1104, también incluidas en el clado I de acuerdo con los estudios realizados por Baráková *et al.* en el 2014, no mostraron esta mutación.

Tabla 4.5. Polimorfismos en el gen *groEL* con respecto a la cepa patógena (U96728) en las muestras positivas a *A. phagocytophilum*

Mutaciones en la secuencia <i>groEL</i> (5'-3')																													Nº acceso Genbank
	29	60	282	285	291	296	324	327	381	450	465	537	615	627	690	697	705	720	721	723	724	729	732	741	744	756	768	780	
U96728	A	C	A	G	A	G	T	A	T	G	C	A	A	A	A	C	C	A	C	G	T	A	A	C	C	C	A	G	U96728
<i>I. ricinus</i>																													
GV036	-	-	G	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	G	A	A	G	T	-	T	-	T	-	-	KJ832450
GV320	G	T	G	A	-	A	G	G	-	A	T	G	G	G	G	T	A	G	A	A	G	T	G	-	T	T	G	A	KF031393
GV348	-	-	-	A	G	-	-	-	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GV450	-	-	G	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	A	G	A	A	G	T	-	T	-	T	-	-	-
GV566	-	-	G	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	G	A	A	G	T	-	T	-	T	-	-	AY220468
GV567	-	-	G	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	G	A	A	G	T	-	T	-	T	-	-	-
GV898	-	-	G	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	G	A	A	G	T	-	T	-	T	-	-	EU552912
<i>I. frontalis</i>																													
GV1104	G	T	G	A	G	A	G	G	-	A	T	G	G	G	G	T	A	G	A	A	G	T	G	-	T	T	G	A	KF031393

Mutaciones en la secuencia <i>groEL</i> (5'-3')																													Nº acceso Genbank
	786	789	789	807	825	846	849	852	864	876	909	949	951	960	969	972	978	990	996	1002	1023	1044	1089	1104	1110	1113	1128	1131	
U96728	A	C	C	C	A	C	A	A	T	T	C	C	T	T	G	A	A	T	T	T	A	T	G	A	A	G	C	T	U96728
<i>I. ricinus</i>																													
GV036	-	-	-	G	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	C	-	G	-	-	-	C	KJ832450
GV320	T	A	A	G	G	T	-	G	A	-	T	T	G	C	-	C	T	A	C	-	G	-	-	-	G	A	T	-	KF031393
GV348	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	A	T	-	-
GV450	-	-	-	G	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-
GV566	-	-	-	G	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AY220468
GV567	-	-	-	G	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GV898	-	-	-	G	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	EU552912
<i>I. frontalis</i>																													
GV1104	T	A	A	G	G	T	-	G	A	-	T	T	G	C	-	C	T	A	C	-	G	-	-	-	G	A	T	-	KF031393

La mayoría de las secuencias obtenidas para el gen *groESL* (5/8) fueron idénticas a otras ya depositadas en el GenBank. Así, las secuencias GV036 y GV566 de *I. ricinus* fueron idénticas a KJ832450 y AY220468 procedentes de corzos capturados en Francia (Chastagner *et al.*, 2014) y República Checa (Petrovec *et al.*, 2003). Por su parte, las secuencias GV320, GV898 y GV1104 de *I. ricinus* e *I. frontalis* mostraron una homología del 100% con las secuencias KF031393 y EU552912 de *I. ricinus* recogidas de un pájaro (Barakova *et al.*, 2014) y de un corzo (Carpi *et al.*, 2009), ambos procedentes de Italia.

Además, para el gen 16S *ARNr* (Tabla 4.6.) estos 8 aislados presentaron entre 1 y 3 mutaciones con respecto a la cepa U02521 (Chen *et al.*, 1994) que se incluye en la denominada variante “B” de *A. phagocytophilum*, con potencial zoonótico (Silaghi *et al.*, 2011). Estas mutaciones correspondieron con las transiciones GxA y AxG en las posiciones 76 y 84, respectivamente y la transición TxG en las posiciones 75 y 82. De este modo, nuestros aislados se incluyeron dentro de las variantes “W” (GV348), “X” (GV036, GV567 y GV898) e “Y” (GV566 y GV450), todas ellas asociadas a *I. ricinus*. Por el contrario, dos de las muestras (GV320 y GV1104) no coincidieron con ninguna variante conocida, lo que también se pudo observar en el árbol filogenético. Los resultados obtenidos para este gen sugieren que, de las 8 variantes de *A. phagocytophilum* halladas, sólo la GV348 pertenece a una variante detectada en humanos, lo que coincide con su distribución en el árbol filogenético, pues se incluye en un clado donde se encuentran cepas patogénicas. Por otro lado, no se pudo determinar el potencial patógeno de las muestras GV320 y GV1104 pues presentaron mutaciones todavía no descritas para este gen.

La mayoría de las secuencias obtenidas para el 16S *ARNr* (5/8) fueron idénticas a otras ya depositadas en el GenBank. Así, las secuencias GV348, GV450 y GV566 de *I. ricinus* fueron idénticas a EU839847 y KC800983 procedentes de sangre de corzo y de bazo de alce capturados en Suiza (Zeman *et al.*, 2008; Malmsten *et al.*, 2014). Por su parte, las secuencias GV036 y GV567 de *I. ricinus* mostraron una homología del 100% con las secuencias KY404195 y JN181070

obtenidas de *I. ricinus* recogidas de un perro en Italia (Morganti *et al.*, 2017) y de un erizo en Noruega (Paulauskas *et al.*, 2012), respectivamente.

Tabla 4.6. Polimorfismos en el gen 16S ARNr con respecto a la cepa patógena (U02521) en las muestras positivas a *A. phagocytophilum*

	Mutaciones en la secuencia 16S ARNr (5'-3')							Nº acceso Genbank
	75	76	77	78	82	84	376	
U02521	T	A	A	A	T	G	G	U02521
<i>I. ricinus</i>								
GV036	-	G	-	-	-	A	-	KY404195
GV320	C	-	-	-	C	A	-	
GV348	-	-	-	-	-	A	-	EU839847
GV450	-	G	-	-	-	-	-	KC800983
GV566	-	G	-	-	-	-	-	KC800983
GV567	-	G	-	-	-	A	-	JN181070
GV898	-	G	-	-	-	A	-	
<i>I. frontalis</i>								
GV1104	C	-	-	-	C	A	-	

Nuestros resultados, analizando estos dos genes, indican que solamente uno de los aislados (GV348) podría considerarse patógeno, lo que demuestra que la presencia de cepas zoonóticas de *A. phagocytophilum* es muy baja en las garrapatas de la zona de estudio y, por ello, también el riesgo de transmisión para el ser humano. En este sentido, se debe indicar que ya se han detectado cepas patógenas para el ser humano de esta bacteria en otras zonas de España, tanto en *I. ricinus* procedentes de la vegetación como en sangre de ciervo rojo (Portillo *et al.*, 2005; Portillo *et al.*, 2011; Palomar *et al.*, 2014); además, también se han diagnosticado casos de anaplasmosis granulocítica humana en nuestro país (Portillo *et al.*, 2005).

Finalmente, cabe señalar que aunque este tipo de estudios pueden aportar datos acerca de la patogenicidad de esta bacteria, no informan

sobre los ecotipos de *A. phagocytophilum* (Dugat *et al.*, 2015; Battilani *et al.*, 2017), lo que impide obtener información sobre las especies de animales implicadas en el mantenimiento de esa cepa en la naturaleza. Se ha señalado que para profundizar en el estudio de los ecotipos de *A. phagocytophilum* presentes en nuestra zona es necesario realizar una tipificación multilocus o una secuenciación genómica completa (Dugat *et al.*, 2014), no siendo éste uno de los objetivos de la presente Tesis.

4.2.2. *Babesia* spp. y *Theileria* spp.

4.2.2.1. Prevalencia total

Mediante la utilización de una PCR a tiempo real comercial (EXOone Piroplasma, Exopol®, Zaragoza, España) se detectó ADN de piroplasmas en el 1,99% de los *I. ricinus* analizados (21/1.056), las otras especies resultaron negativas. Estas muestras se confirmaron y caracterizaron molecularmente mediante la realización de dos protocolos de PCR convencional que amplifican fragmentos del espacio intergénico transcrito 1 (ITS1) y del gen que codifica para el ARN ribosómico 18S (18S ARNr) de *Babesia* spp. y *Theileria* spp (Zahler *et al.*, 2000; Blaschitz *et al.*, 2008; da Silveira *et al.*, 2011; Bajer *et al.*, 2014). El análisis de las secuencias obtenidas permitió determinar que 19 de las 21 garrapatas positivas estaban infectadas con *Babesia* spp. y solamente dos con *Theileria* spp., lo que se tradujo en un porcentaje de infección en *I. ricinus* del 1,80% (19/1.056) y del 0,19% (2/1.056), respectivamente.

La prevalencia de *Babesia* spp. hallada en este estudio fue ligeramente superior a la descrita previamente en *I. ricinus* capturados en la vegetación en el norte de España, en la que solamente un 0,5% de las garrapatas resultaron positivas (García-SanMartín *et al.*, 2008), mientras que la prevalencia de *Theileria* spp. fue inferior a la detectada en ese estudio (8,3%). En Europa, en general, la prevalencia de ambos protozoos en *I. ricinus* capturados de la vegetación es baja y suele hallarse por debajo del 5% (Schorn *et al.*, 2011; Oines *et al.*,

2012; Bonnet *et al.*, 2013; Reye *et al.*, 2013; Svehlova *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015; Karlsson y Andersson, 2016; Asman *et al.*, 2017; Jouglin *et al.*, 2017; Schötta *et al.*, 2017). Sin embargo, Edelhofer y Baumgartner (1996) y Blaschitz *et al.* (2008) detectaron prevalencias de *Babesia* spp. superiores al 20% en Austria, alcanzando incluso el 50%, lo que atribuyeron a la diferente densidad de garrapatas presente en las zonas de muestreo. De este modo, cuando existen elevadas poblaciones de garrapatas en un área muy reducida, es posible obtener una alta prevalencia de *Babesia* spp. si las garrapatas recogidas son progenie de una misma población de garrapatas infectada con el parásito, debido a la transmisión transovárica de este parásito en el vector.

Aunque tanto *D. marginatus* como *D. reticulatus* pueden actuar como vectores de ciertas especies de piroplasmas como *B. caballi* y *T. equi* (Jongejan *et al.* 2015), ninguno de los ejemplares procesados en este trabajo resultó positivo. En otros países de Europa como Eslovaquia o Polonia se han encontrado ejemplares de *Dermacentor* spp. positivos a *Babesia* spp. y *Theileria* spp. con prevalencias bajas que oscilan entre el 0,5% y el 5% (Bonnet *et al.*, 2013; Spitalská *et al.*, 2014; Zajac *et al.*, 2017). En un estudio realizado en Francia, Bonnet *et al.* (2013) detectaron un escaso número de *D. marginatus* positivos a *Babesia* spp. (0,3%) y *Theileria* spp. (0,3%), mientras que todos los especímenes de *D. reticulatus* analizados resultaron negativos a ambos patógenos. Los reducidos porcentajes de infección detectados en *Dermacentor* spp. de Europa podrían explicar la ausencia de positivos en este estudio, debido al escaso número de especímenes analizados de este género.

En la actualidad, la información sobre la posible capacidad vectorial de ciertas especies de garrapatas como *I. frontalis* o *I. acuminatus* es muy escasa. En este sentido, únicamente se han publicado dos trabajos que analizaron la presencia de *Babesia* spp. y *Theileria* spp. en estas dos especies de garrapatas (Monks *et al.*, 2006; Aureli *et al.*, 2015); sin embargo, en ambas investigaciones no se detectaron ejemplares positivos a estos protozoos.

4.2.2.2. Especies y prevalencia

El análisis de las secuencias del espacio intergénico 1 y del gen que codifica para el 18S *ARNr* de *Babesia* spp. y *Theileria* spp. permitió la identificación de tres especies de piroplasmas: *B. venatorum*, *B. microti* y *T. sp. OT3*, con prevalencias del 1,52%, 0,28% y del 0,19%, respectivamente. Todas las secuencias obtenidas para el 18S *ARNr* de *B. venatorum*, *B. microti* y *T. sp. OT3* fueron idénticas a las depositadas en el GenBank con los números de acceso KM289158, LC314655 y KF470868, respectivamente (Tabla 4.7.). La secuencia de referencia de *B. venatorum* procedía de un *I. ricinus* recogido de la vegetación en España (Ros-García y Hurtado, no publicado) mientras que las otras dos se obtuvieron a partir de sangre de una oveja, en el caso de *T. sp. OT3* (Tian *et al.*, 2014), y de una línea de *B. microti* procedente de infecciones humanas, ambas procedentes de China (Sayama *et al.*, 2018).

Las secuencias obtenidas para el ITS1 de *B. venatorum* fueron idénticas a la secuencia HM113372 procedente de un *I. ricinus* capturado en Alemania (Leonhard *et al.*, no publicado). Por el contrario las secuencias de *B. microti* mostraron una similitud del 74-95% con respecto a varias secuencias identificadas como *B. microti* (AB190435; AB190459; AB112337; GU230755; LN871598; AF510194; AF510195; AF510197; AF510198). En este sentido, cabe señalar que en esta base de datos existe una gran variabilidad en las secuencias del ITS1 de *B. microti*, que pueden alcanzar diferencias del 10-20% entre algunas secuencias ya depositadas. Estas secuencias también mostraron una homología del 97% con una de *Babesia muratovi* (AF510202), incluida en un estudio sobre la variabilidad genética de *B. microti* (Zahler-Rinder *et al.*, no publicado); sin embargo, ésta es la única secuencia depositada de *B. muratovi*. A pesar de las discrepancias obtenidas para el ITS1, la identificación de estas muestras como *B. microti* se confirmó mediante el análisis de las secuencias del gen 18S *ARNr*.

La secuencia de *T. sp.* OT3 para el ITS1 presentó mala calidad, lo que impidió alcanzar una identificación correcta para esta diana genética.

Tabla 4.7. Especies de *Babesia* y *Theileria* identificadas, número de garrapatas positivas, secuencia de referencia y porcentaje de identidad con respecto a la misma

	Nº garrapatas	N.º acceso	Identidad (%)
Gen 18S ARNr			
<i>B. venatorum</i>	16	KM289158	100
<i>B. microti</i>	3	LC314655	100
<i>T. sp.</i> OT3	2	KF470868	100
Espacio intergénico 1			
<i>B. venatorum</i>	16	HM113372	100
<i>B. microti</i>	3	-	95
<i>T. sp.</i> OT3	2	KF470865-KF470867	90

Nuestros resultados indican que *B. venatorum* fue el piroplasma más abundante en *I. ricinus*, el cual constituye su principal vector (Malandrin *et al.*, 2010). Esta especie de *Babesia* se considera zoonótica y responsable de la aparición de casos de babesiosis humana en Europa (Herwaldt *et al.*, 2003). Se ha aislado con frecuencia en ungulados silvestres como corzos (Duh *et al.*, 2005; Tampieri *et al.*, 2008; Zanet *et al.*, 2014) y muflones (Kauffman *et al.*, 2016), así como en ejemplares libres de *I. ricinus*, aunque las prevalencias son bajas (0,3-1%), lo que coincide con los resultados del presente estudio (Katargina *et al.*, 2011; Schorn *et al.*, 2011; Lommano *et al.*, 2012; Øines *et al.*, 2012; Reye *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Capligina *et al.*, 2016; Karlsson y Andersson, 2016).

En Europa, *B. microti* es una especie de *Babesia* presente en especies de *Ixodes* como *I. ricinus* e *I. persulcatus*, con prevalencias que oscilan entre el 0,5 y el 3% (Katargina *et al.*, 2011; Reye *et al.*, 2013; Capligina *et al.*, 2016; Karlsson y Andersson, 2016) lo que coincide con los resultados hallados en Galicia. Sin embargo, su principal vector es *I. trianguliceps*, que se caracteriza por parasitar pequeños roedores (Bown *et al.*, 2008). Además, esta especie de

Babesia no es frecuente en *Dermacentor* spp.; en un estudio realizado en Polonia se identificó este piroplasma en el 2,7% de los *D. reticulatus* capturados de la vegetación (Wójcik-Fatla *et al.*, 2015), aunque todavía se desconoce su capacidad vectorial. *Babesia microti* y *B. divergens* son las principales especies de *Babesia* causantes de zoonosis en Estados Unidos y Europa, respectivamente (Antunes *et al.*, 2017) y, al igual que ocurre con *B. venatorum*, ambas se consideran un patógeno emergente con especial interés sobre la salud humana (Baráková *et al.*, 2018).

Theileria sp. OT3 se detectó en dos especímenes de *I. ricinus*. La información sobre la dinámica de transmisión de esta especie de *Theileria*, incluyendo la identidad de su principal vector, es todavía limitada (Giangaspero *et al.*, 2015). En Europa, esta especie se ha identificado en diferentes rumiantes silvestres como corzos, ciervos rojos, gamos y rebecos (García-SanMartín *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2016), así como en ovejas (Nagore *et al.*, 2004; Giangaspero *et al.*, 2015; Bilgic *et al.*, 2017). Como todas las especies de *Theileria*, carece de potencial zoonótico y se ha sugerido que los cérvidos silvestres actúan como reservorios asintomáticos (García-SanMartín *et al.*, 2007).

4.2.2.3. Dinámica de infección

Cuando se estudió el posible efecto de diferentes variables sobre la prevalencia de estos piroplasmas, se observó que aunque todos los estadios de desarrollo de *I. ricinus* resultaron positivos a *Babesia* spp. (Tabla 4.8.), los únicos ejemplares positivos a *Theileria* spp. fueron ninfas. La prevalencia de *Babesia* spp. fue mayor en ninfas que en adultos, sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Al considerar las especies de *Babesia* identificadas, solamente *B. venatorum* se detectó tanto en ninfas como en adultos, con prevalencias del 1,69% y del 1,24%, respectivamente, mientras que *B. microti* se detectó únicamente en ninfas. Se ha comprobado la transmisión transovárica de ciertas especies de *Babesia*, entre las que se incluye *B. venatorum* (Bonnet *et al.*, 2007), lo que podría explicar

la ausencia de diferencias significativas en la prevalencia hallada en ninfas y adultos; estos resultados coinciden con los observados en otros estudios (Lommano *et al.*, 2012; Karlsson y Andersson, 2016).

Tabla 4.8. Prevalencia de las especies de piroplasmas en los distintos estadios de *I. ricinus*

	Ninfas	Hembras	Machos	TOTAL
<i>Babesia</i> spp.				
<i>B. venatorum</i>	11/652 (1,69%)	3/202 (1,49%)	2/202 (0,99%)	16/1.056 (1,52%)
<i>B. microti</i>	3/652 (0,46%)	0/202 (0%)	0/202 (0%)	3/1.056 (0,28%)
TOTAL	14/652 (2,15%)	3/202 (1,49%)	2/202 (0,99%)	19/1.056 (1,80%)
<i>Theileria</i> spp.				
<i>T. sp. OT3</i>	2/652 (0,31%)	0/202 (0%)	0/202 (0%)	2/1.056 (0,19%)

Al tener en cuenta el año de estudio, se observó que las prevalencias de *Babesia* spp. fueron similares durante ambos años de muestreo (Tabla 4.9.) no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$). *Babesia venatorum* se detectó en ambos años de muestreo, mientras que *B. microti* se identificó únicamente durante el primer año y *T. sp. OT3* durante el segundo.

Tabla 4.9. Prevalencia de las especies de piroplasmas en *I. ricinus* en función del año de muestreo

	Año 1	Año 2	TOTAL
<i>Babesia</i> spp.			
<i>B. venatorum</i>	7/534 (1,31%)	9/522 (1,72%)	16/1.056 (1,52%)
<i>B. microti</i>	3/534 (0,56%)	0/522 (0%)	3/1.056 (0,28%)
TOTAL	10/534 (1,87%)	9/522 (1,72%)	19/1.056 (1,80%)
<i>Theileria</i> spp.			
<i>T. sp. OT3</i>	0/534 (0%)	2/522 (0,38%)	2/1.056 (0,19%)

Al estudiar el posible efecto de la estación del año sobre los porcentajes de infección por piroplasmas (Tabla 4.10.), se observó que la prevalencia de *Babesia* spp. resultó más elevada durante las estaciones frías; sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Los dos especímenes positivos a *Theileria* spp. fueron capturados en primavera.

Tabla 4.10. Prevalencia de las especies de piroplasmas en *I. ricinus* al considerar la estación de muestreo

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	TOTAL
<i>Babesia</i> spp.					
<i>B. venatorum</i>	5/437 (1,14%)	5/259 (1,93%)	2/148 (1,35%)	4/212 (1,89%)	16/1.056 (1,52%)
<i>B. microti</i>	0/437 (0%)	0/259 (0%)	2/148 (1,35%)	1/212 (0,47%)	3/1.056 (0,28%)
TOTAL	5/437 (1,14%)	5/259 (1,93%)	4/148 (2,70%)	5/212 (2,36%)	19/1.056 (1,80%)
<i>Theileria</i> spp.					
<i>T. sp. OT3</i>	2/437 (0,46%)	0/259 (0%)	0/148 (0%)	0/212 (0%)	2/1.056 (0,19%)

Al analizar la influencia del área de muestreo (Tabla 4.11.) se observó que la prevalencia de *Babesia* spp. fue ligeramente superior en la zona de costa; sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Además, en esta zona fue donde se detectaron las dos especies de *Babesia* identificadas en el presente estudio.

Tabla 4.11. Prevalencia de las especies de de piroplasmas en *I. ricinus* según la zona de muestreo

	Meseta	Montaña	Costa	TOTAL
<i>Babesia</i> spp.				
<i>B. venatorum</i>	3/272 (1,10%)	4/372 (1,08%)	9/412 (2,18%)	16/1.056 (1,52%)
<i>B. microti</i>	0/272 (0%)	0/372 (0%)	3/412 (0,73%)	3/1.056 (0,28%)
TOTAL	3/272 (1,10%)	4/372 (1,08%)	12/412 (2,91%)	19/1.056 (1,80%)
<i>Theileria</i> spp.				
<i>T. sp. OT3</i>	1/272 (0,37%)	1/372 (0,27%)	0/412 (0%)	2/1.056 (0,19%)

Se cree que la distribución de *B. microti* está asociada a la de sus hospedadores principales (*Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Myodes* spp. y *Sorex* spp.), especialmente de *Microtus* spp. Este género incluye varias especies de topillos que prefieren hábitats abiertos, por lo que no presentan una distribución tan amplia como otros géneros; esto podría explicar porqué solamente se detectó *B. microti* en una de las

áreas estudiadas. Se ha sugerido que esta especie de *Babesia* se mantiene en áreas muy localizadas, dependiendo de la densidad de garrapatas de la zona (Foppa *et al.*, 2002), generando un microhábitat en el que el patógeno se transmite transováricamente, al mismo tiempo que se mantiene en una población de reservorios.

Los especímenes positivos a *T. sp.* OT3 se capturaron en la zona de meseta y montaña. Sin embargo, la escasa información sobre los vectores de esta especie de *Theileria*, junto con la baja prevalencia encontrada, imposibilita su estudio.

4.2.3. *Borrelia* spp.

4.2.3.1. Prevalencia total

Tras la realización de una PCR convencional que amplifica un fragmento del gen que codifica para la flagelina (*fla*) de *Borrelia* spp., se detectó ADN de esta bacteria en el 12,31% de los ejemplares procesados de *I. ricinus* (130/1.056). Esta prevalencia es menor a la hallada previamente en un estudio transversal realizado por Díaz *et al.* (2017) en garrapatas procedentes de la misma área de estudio (18,8%); esto podría deberse a que el presente estudio es longitudinal y el número de áreas muestreadas fue menor. No obstante, en ambos trabajos se confirma que esta espiroqueta se encuentra ampliamente distribuida en las garrapatas de Galicia siendo también la comunidad autónoma dónde se ha detectado una mayor incidencia de la Enfermedad de Lyme (Guerrero-Espejo y Gimeno, 2016).

No se detectó ADN de *Borrelia* spp. en ningún ejemplar de *I. frontalis* ni de *I. acuminatus*. Sin embargo, se ha demostrado que estas especies pueden actuar como vectores de ciertas genoespecies del grupo *B. burgdorferi* s.l. (Heylen *et al.*, 2013). Además, varios autores han indicado que *I. acuminatus* podría desarrollar un papel importante en ciclo endófilo de *B. afzelii* (Szekeres *et al.*, 2015). Tampoco se detectó ningún ejemplar de *D. marginatus* y *D. reticulatus* infectado por este patógeno, lo que coincide con lo señalado por Johns *et al.* (2001) y Grubhoffer *et al.* (2005) quienes afirmaron que, aunque las

garrapatas del género *Dermacentor* puedan llegar a infectarse con *Borrelia*, su sistema inmune podría eliminar la espiroqueta; por el contrario, otros autores hallaron prevalencias de infección inferiores al 3,4% en estas garrapatas, aunque también consideraron que *D. marginatus* y *D. reticulatus* no son vectores de este patógeno (Bonnet *et al.*, 2013; Reye *et al.*, 2013; Zajac *et al.*, 2017).

Sin embargo, como se señaló anteriormente, el número de ejemplares de *I. acuminatus*, *I. frontalis*, *D. marginatus* y *D. reticulatus* recogidos y analizados fue reducido por lo que, teniendo en cuenta las bajas prevalencias esperadas, sería necesario analizar un número mayor de estas garrapatas para confirmar la ausencia de infección por *Borrelia* spp. en la zona de estudio.

4.2.3.2. Especies/genoespecies y prevalencia

La secuenciación permitió la identificación de 6 especies/genoespecies patógenas de *Borrelia*, 5 de ellas pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* s.l. (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s.s. y *B. lusitaniae*) y 1 perteneciente al grupo de borrelias causantes de la fiebre recurrente (*B. miyamotoi*). Tras el análisis de las secuencias, se comprobó que la mayoría eran idénticas a las depositadas previamente en el GenBank o mostraban como máximo un único polimorfismo de un nucleótido (Tabla 4.12.). La mayoría de las secuencias obtenidas en este trabajo se correspondieron con las halladas previamente en *I. ricinus* infectados con *Borrelia* spp. en Galicia (Díaz *et al.*, 2017), indicadas con un asterisco (*) en la Tabla 4.12.; el resto de secuencias se correspondieron, en su mayoría, con *I. ricinus* procedentes de otras zonas de Europa. Cuando la positividad de una muestra se pudo confirmar con más de un gen, se identificó la misma especie/genoespecie en ambos casos. Aquellas secuencias que presentaban mutaciones con respecto a la de referencia se depositaron en GenBank bajo los números de acceso comprendidos entre el MK256765 y el MK256778.

Tabla 4.12. Especies y genopecies de *Borrelia* halladas en *Ixodes ricinus* del noroeste de España, número de garrapatas infectadas, número de acceso de la secuencia de referencia y porcentaje de identidad con respecto a la misma

	Nº garrapatas	Nº acceso	Identidad (%)	Nuevo Nº acceso
Gen de la flagelina de <i>Borrelia</i> spp. (<i>fla</i>)				
<i>B. afzelii</i> (n=51)	2	KY213885	100	
	5	MG245774*	100	
	44	MG944963*	100	
<i>B. burgdorferi</i> s.s. (n=10)	2	MF150053	100	
	6	MF150052	100	
	1	MF150052	99	MK256768
	1	KX646200	100	
<i>B. garinii</i> (n=38)	1	KX646198	99	MK256765
	3	MF150066	100	
	2	MF150066	99	MK256767
	4	MG245779*	100	
	8	MG245781*	100	
	5	MG245783*	100	
	2	MG245784*	100	
	2	MG245785*	100	
	7	MG245786*	100	
	3	MG245786*	99	MK256766
	1	MG245780*	100	
<i>B. lusitaniae</i> (n=5)	1	KY213887	100	
	2	MG245772*	100	
	1	MG245772*	99	MK256769
	1	MG245773*	100	
<i>B. valaisiana</i> (n=17)	3	MG245777*	100	
	10	MG245775*	100	
	3	MG245775*	99	MK256771 MK256772
	1	MF150078	100	
<i>B. miyamotoi</i> (n=9)	4	KT932823	100	
	3	KT932823	99	MK256770
	2	KX646199	100	

Tabla 4.12. (continuación)

	Nº garrapatas	Nº acceso	Identidad (%)	Nuevo Nº acceso
Espacio intergénico de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. (IGS)				
<i>B. afzelii</i>	3	CP018262	100	
(n=4)	1	CP018262	99	MK256776
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	3	CP019767	100	
(n=4)	1	CP017201	100	
<i>B. garinii</i>	2	CP018744	99	MK256777
(n=11)	1	FM993432	100	
	3	MG356950*	100	
	1	MG356951*	100	
	2	MG356954*	100	
	1	MG356956*	100	
	1	MG356956*	99	MK256778
<i>B. lusitaniae</i>	2	MG245789*	100	
(n=3)	1	MG245789*	99	MK256775
<i>B. valaisiana</i>	4	CP009117	100	
(n=6)	1	CP009117	99	MK256774
	1	MG356954*	100	
Gen del glicerol fosfodiester fosfodiesterasa de borrelias del grupo fiebre recurrente (<i>glpQ</i>)				
<i>B. miyamotoi</i>	8	MG451835*	100	
(n=9)	1	MG451835*	99	MK256773

Las secuencias obtenidas tanto para el gen de la flagelina (*fla*) como para el espacio intergénico (IGS) de *Borrelia* spp. se seleccionaron, junto con varias secuencias de referencia del Genbank, para realizar un árbol filogenético (Figuras 4.10. y 4.11.).

Los árboles filogenéticos obtenidos permitieron confirmar la identificación de las genopecies de *Borrelia* separándolas en seis grandes ramas que se correspondieron con cada una de las genopecies identificadas. Además, ambos árboles muestran con claridad la diversidad genética existente en *B. garinii*. El árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de la flagelina también muestra a *B. miyamotoi* dentro de una rama separada de las borrelias pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* s.l.

Las genopecies de *Borrelia* más abundantes en *I. ricinus* fueron *B. afzelii* (4,83%; 51/1.056), *B. garinii* (3,79%; 40/1.056) y *B.*

valaisiana (1,80%; 19/1.056), genoespecies reconocidas como agentes causales de la enfermedad de Lyme. Sin embargo, la prevalencia de otras genoespecies/especies como *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* y *B. miyamotoi* fue inferior al 1%. Solamente se encontraron coinfecciones entre los distintos grupos de *Borrelia* spp. en tres ninfas y una hembra, lo que supone una prevalencia del 0,38% (4/1.056). Las coinfecciones encontradas fueron *B. miyamotoi*/*B. valaisiana* (0,19%) y *B. miyamotoi*/*B. garinii* (0,19%).

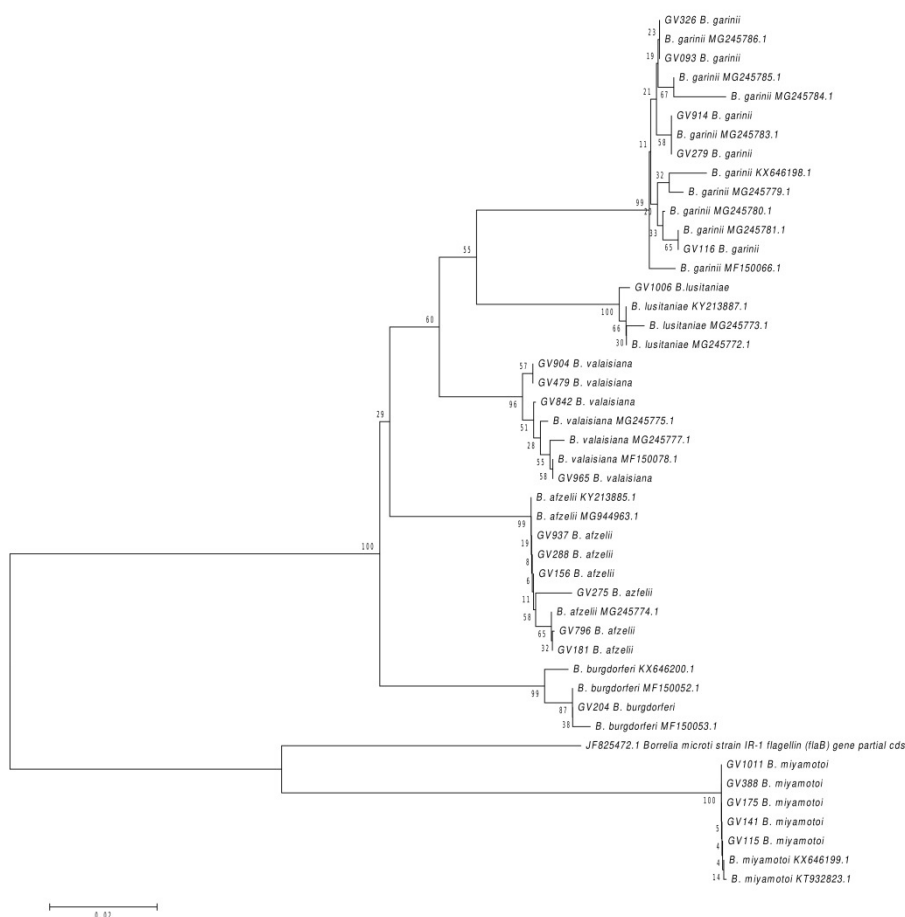


Figura 4.10. Árbol filogenético obtenido mediante la secuencia del gen de la flagelina de *Borrelia* spp. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

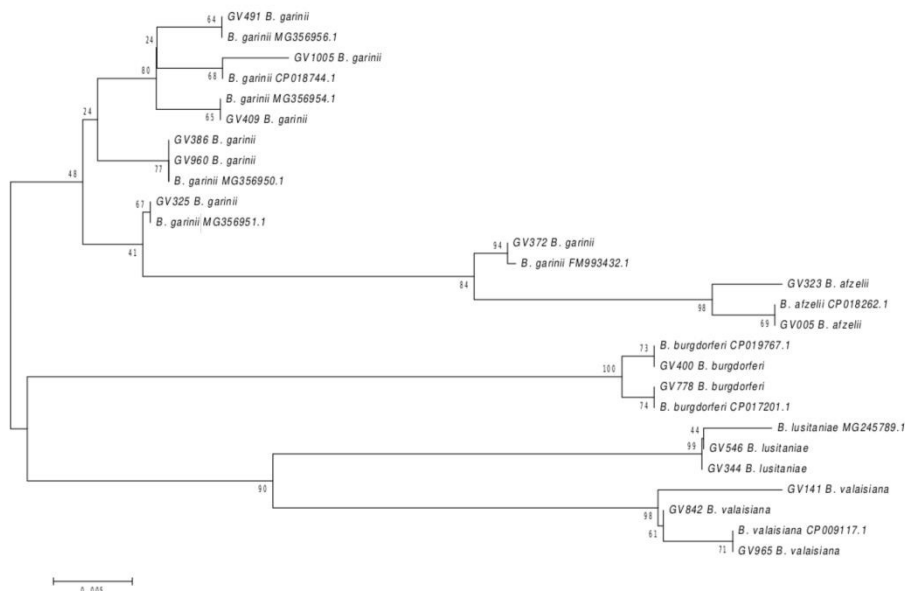


Figura 4.11. Árbol filogenético obtenido mediante la secuencia del gen IGS de *Borrelia* spp. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

Todas las genopecies identificadas ya se habían detectado previamente en un estudio realizado en Galicia (Díaz *et al.*, 2017); además, en un trabajo realizado en una comunidad autónoma adyacente también se había observado que *B. afzelii* y *B. garinii* eran las genopecies predominantes (Espí *et al.*, 2017); así mismo, ambas genopecies también fueron las más prevalentes en pacientes diagnosticados de EL en Galicia (Vázquez-López *et al.*, 2016 a, b), observándose que los signos más frecuentes son los dermatológicos y neurológicos, éstos últimos asociados a *B. garinii* (Vázquez-López *et al.*, 2015). La elevada prevalencia de *B. afzelii* puede deberse, entre otras razones, a que recientemente se ha demostrado su transmisión transovárica en garrapatas, por lo que las larvas infectadas podrían transmitir la espiroqueta a roedores e incluso a humanos (van

Duijvendijk *et al.*, 2016). Se cree que las diferencias en la distribución de las genoespecies del grupo *B. burgdorferi* s.l. está determinada, entre otros motivos, por la población de hospedadores existente en la zona y su papel como reservorios de las mismas (Estrada-Peña *et al.*, 2011). De este modo, *B. afzelii* y *B. bavariensis* están asociadas a pequeños roedores (Huegli *et al.*, 2002; Hanincová *et al.*, 2003), *B. valaisiana* y *B. garinii* con aves (Hanincová *et al.*, 2003) y *B. spielmanii* con lirones (Richter *et al.*, 2006). Además, esta relación también depende de la zona geográfica ya que, por ejemplo, *B. burgdorferi* s.s. está relacionada con roedores en Estados Unidos y con pájaros y mamíferos de pequeño tamaño en Europa (Tilly *et al.*, 2008).

Borrelia miyamotoi se considera patógena para las personas (Wagemakers *et al.*, 2015) y, debido a su transmisión transestadial y transovárica en la garrapata (Scoles *et al.*, 2001), todos los estadios de desarrollo de *I. ricinus* entrañan un riesgo de infección para las personas. La prevalencia media de *B. miyamotoi* en las garrapatas fue baja (0,85%) y similar a la hallada en Galicia por Díaz *et al.* (2017). Además, fue levemente inferior a la observada por diversos autores (Pichon *et al.*, 2005; Lommano *et al.*, 2012; Vayssier-Taussat *et al.*, 2013; Wilhelmsson *et al.*, 2013; Kiewra *et al.*, 2014; Michelet *et al.*, 2014; Cochez *et al.*, 2015) en otros países europeos como Dinamarca, Bélgica, Francia, Irlanda, Países Bajos, Polonia, Suiza y Suecia, en los que se han citado prevalencias que oscilan entre el 1% y el 4%. Sin embargo, la prevalencia hallada en nuestro estudio es ligeramente superior a la encontrada en República Checa, Inglaterra y Estonia (Geller *et al.*, 2012; Crowder *et al.*, 2014; Hansford *et al.*, 2014) con prevalencias inferiores al 0,5%.

4.2.3.3. Dinámica de infección

Para conocer la dinámica de la infección por *Borrelia* spp. en *I. ricinus* se estudió el efecto de las diferentes variables analizadas (estadio de desarrollo de la garrapata, año, estación y zona de muestreo) sobre la prevalencia de esta espiroqueta. Esta información

es útil para establecer que regiones o periodos del año suponen un mayor riesgo para la transmisión de las especies y genoespecies de *Borrelia* a las personas.

Todas las especies y genoespecies identificadas se encontraron en todos los estadios de desarrollo de *I. ricinus* (Tabla 4.13.), aunque se observaron notables diferencias en la prevalencia encontrada, tanto para *B. burgdorferi* s.l. como para *B. miyamotoi*.

Tabla 4.13. Prevalencia de las especies y genoespecies de *Borrelia* en los distintos estadios de *I. ricinus*

	Ninfas	Hembras	Machos	TOTAL
<i>B. burgdorferi</i> s.l				
<i>B. afzelii</i>	33/652 (5,06%)	12/202 (5,94%)	6/202 (2,97%)	51/1.056 (4,83%)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	4/652 (0,61%)	2/202 (0,99%)	4/202 (1,98%)	10/1.056 (0,95%)
<i>B. garinii</i>	16/652 (2,45%)	16/202 (7,92%)	8/202 (3,96%)	40/1.056 (3,79%)
<i>B. lusitaniae</i>	1/652 (0,15%)	3/202 (1,49%)	1/202 (0,50%)	5/1.056 (0,47%)
<i>B. valaisiana</i>	11/652 (1,69%)	7/202 (3,47%)	1/202 (0,50%)	19/1.056 (1,80%)
TOTAL	65/652 (9,97%)	40/202 (19,80%)	20/202 (9,90%)	125/1.056 (11,84%)
Borrelia pertenientes al grupo de las fiebres recurrentes				
<i>B. miyamotoi</i>	3/652 (0,46%)	4/202 (1,98%)	2/202 (0,99%)	9/1.056 (0,85%)

En el caso de *B. burgdorferi* s.l., las hembras presentaron una prevalencia mayor (19,80%) que los machos (9,90%) y las ninfas (9,97%), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 18,766$, $p < 0,001$). Estos resultados coinciden con lo observado en otros estudios (Jouda *et al.*, 2004; Kampen *et al.*, 2004; Sormunen *et al.*, 2006; Soleng *et al.*, 2013; Espí *et al.*, 2017) en los que se relacionó este hecho con el número de alimentaciones que había realizado la garrapata para poder llegar a ese estadio, así como por la cantidad de sangre ingerida (Matuschka *et al.*, 1993; Dusbábek, 1996). Como en la mayoría de las genoespecies del grupo *B. burgdorferi* s.l. no existe

transmisión transovárica (Krause *et al.*, 2015), se considera que son las ninfas y los adultos los que contribuyen al mantenimiento de estas espiroquetas en la naturaleza (Estrada-Peña *et al.*, 2011). No obstante, las ninfas son el estadio de mayor importancia epidemiológica, especialmente para la transmisión de esta espiroqueta al ser humano, ya que los machos de *I. ricinus* normalmente no se alimentan y las hembras lo suelen hacer de animales de gran tamaño que no se consideran reservorios competentes de *B. burgdorferi* s.l. (Gern y Humair, 2002). La prevalencia de *B. miyamotoi*, también fue superior en las hembras (1,98%) que en los machos (0,99%) y en las ninfas (0,46%), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Al tener en cuenta el año de estudio, se observó que las prevalencias de *B. burgdorferi* s.l. y *B. miyamotoi* fueron superiores durante el primer año (Tabla 4.14.), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Tabla 4.14. Prevalencia de las especies y geno-especies de *Borrelia* en *I. ricinus* en función del año de muestreo

	Año 1	Año 2	TOTAL
<i>B. burgdorferi</i> s.l.			
<i>B. afzelii</i>	32/534 (5,99%)	19/522 (3,64%)	51/1.056 (4,83%)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	7/534 (1,31%)	3/522 (0,57%)	10/1.056 (0,95%)
<i>B. garinii</i>	20/534 (3,75%)	20/522 (3,83%)	40/1.056 (3,79%)
<i>B. lusitaniae</i>	1/534 (0,19%)	4/522 (0,77%)	5/1.056 (0,47%)
<i>B. valaisiana</i>	8/534 (1,50%)	11/522 (2,11%)	19/1.056 (1,80%)
TOTAL	68/534 (12,73%)	57/522 (10,92%)	125/1.056 (11,84%)
<i>Borrelia</i> del grupo de las fiebres recurrentes			
<i>B. miyamotoi</i>	6/534 (1,12%)	3/522 (0,57%)	9/1.056 (0,85%)

Al estudiar el efecto de la estación del año sobre los porcentajes de infección por *Borrelia* spp., se observó que la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. fue superior en verano (15,44%) mientras que la prevalencia de *B. miyamotoi* lo fue en invierno (1,42%); sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en ningún caso ($p > 0,05$) (Tabla 4.15.).

Tabla 4.15. Prevalencia de las especies y genoespecies de *Borrelia* en *I. ricinus* al considerar la estación de muestreo

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	TOTAL
<i>B. burgdorferi</i> s.l					
<i>B. afzelii</i>	25/437 (5,72%)	17/259 (6,56%)	2/148 (1,35%)	7/212 (3,30%)	51/1.056 (4,83%)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	4/437 (0,92%)	2/259 (0,77%)	3/148 (2,03%)	1/212 (0,47%)	10/1.056 (0,95%)
<i>B. garinii</i>	16/437 (3,66%)	15/259 (5,79%)	4/148 (2,70%)	5/212 (2,36%)	40/1.056 (3,79%)
<i>B. lusitaniae</i>	3/437 (0,69%)	1/259 (0,39%)	1/148 (0,68%)	0/212 (0%)	5/1.056 (0,47%)
<i>B. valaisiana</i>	9/437 (2,06%)	5/259 (1,93%)	1/148 (0,68%)	4/212 (1,89%)	19/1.056 (1,80%)
TOTAL	57/437 (13,04%)	40/259 (15,44%)	11/148 (7,43%)	17/212 (8,02%)	125/1.056 (11,84%)
<i>Borrelia</i> pertenientes al grupo de las fiebres recurrentes					
<i>B. miyamotoi</i>	2/437 (0,46%)	3/259 (1,16%)	1/148 (0,68%)	3/212 (1,42%)	9/1.056 (0,85%)

En la Figura 4.12. se representa la distribución de las genoespecies/especies de *Borrelia* a lo largo de los meses de muestreo, observándose la ausencia de un patrón estacional, lo que coincide con otros estudios (Jouda *et al.*, 2004; Estrada-Peña *et al.*, 2011; James *et al.*, 2013); sin embargo, otros autores sugirieron la existencia de un patrón que podría estar influido por múltiples variables entre las que destacan la composición de hospedadores de la zona de muestreo y su competencia como reservorios (Tälleklint y Jaenson, 1996; Kurtenbach *et al.*, 2006).

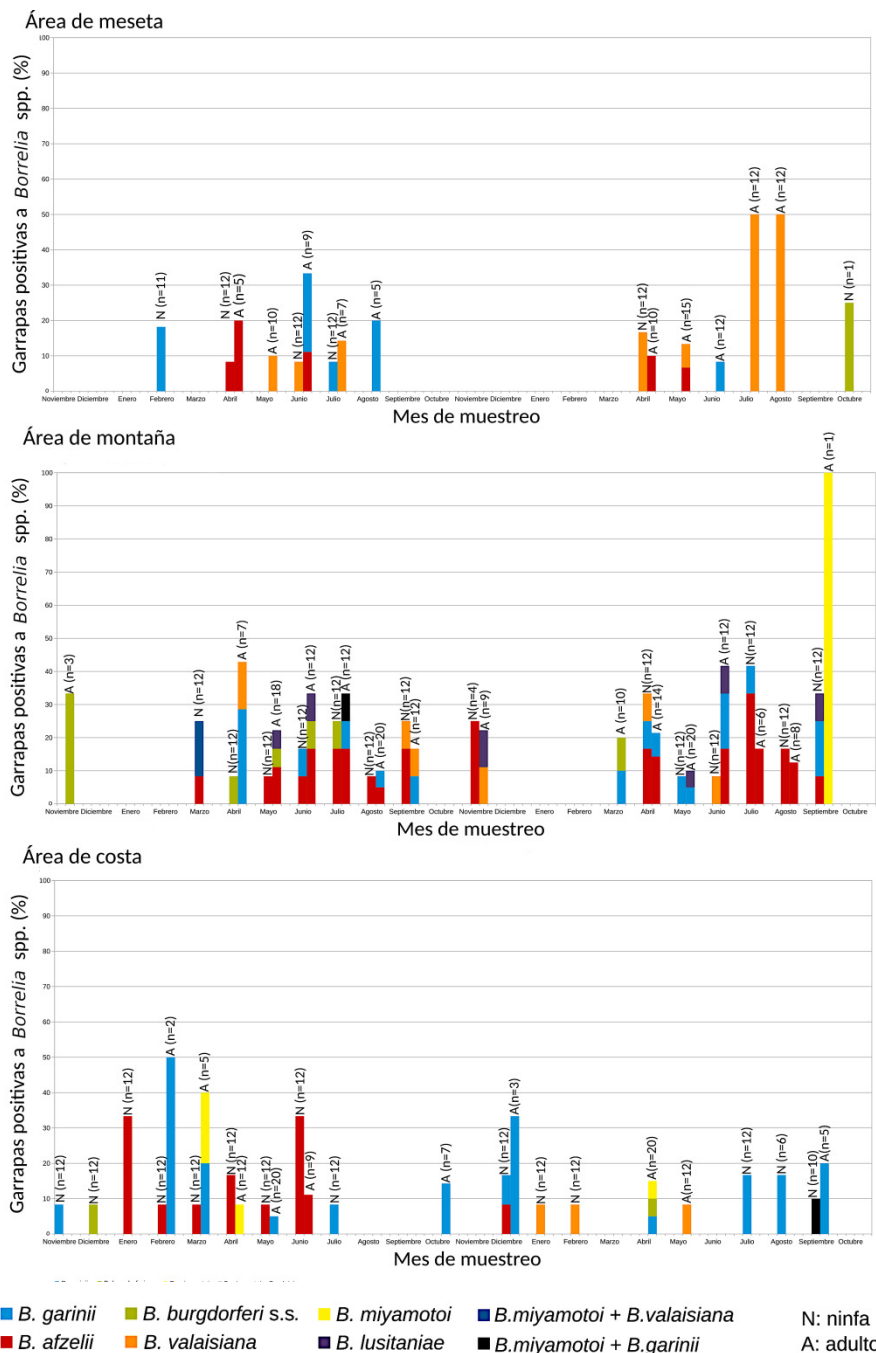


Figura 4.12. Prevalencia mensual de *Borrelia* spp. en *I. ricinus* en las tres áreas de muestreo

Al analizar si existían diferencias en las prevalencias de las genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. al considerar las tres áreas de muestreo (Tabla 4.16.), se observó que ésta era significativamente más elevada (18,55%) en la montaña que en la costa (8,25%; $\chi^2 = 17,269$; $p < 0,001$) y en la meseta (8,09%; $\chi^2 = 13,319$; $p < 0,001$). Además, en la zona de montaña, se detectaron prevalencias significativamente más elevadas para *B. afzelii* ($\chi^2 = 16,498$; $p < 0,001$). *Borrelia lusitaniae* solamente se identificó en la montaña, siendo ésta la única zona en la que se hallaron todas las genoespecies de *Borrelia*.

Tabla 4.16. Prevalencia de las especies y genoespecies de *Borrelia* según la zona de muestreo.

	Meseta	Montaña	Costa	TOTAL
<i>B. burgdorferi</i> s.l				
<i>B. afzelii</i>	5/272 (1,84%)	31/372 (8,33%)	15/412 (3,64%)	51/1.056 (4,83%)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1/272 (0,37%)	7/372 (1,88%)	2/412 (0,49%)	10/1.056 (0,95%)
<i>B. garinii</i>	8/272 (2,94%)	18/372 (4,84%)	14/412 (3,40%)	40/1.056 (3,79%)
<i>B. lusitaniae</i>	0/272 (0%)	5/372 (1,34%)	0/412 (0%)	5/1.056 (0,47%)
<i>B. valaisiana</i>	8/272 (2,94%)	8/372 (2,15%)	3/412 (0,73%)	19/1.056 (1,80%)
TOTAL	22/272 (8,09%)	69/372 (18,55%)	34/412 (8,25%)	125/1.056 (11,84%)
<i>Borrelia</i> del grupo de las fiebres recurrentes				
<i>B. miyamotoi</i>	0/272 (0%)	4/372 (1,08%)	5/412 (1,21%)	9/1.056 (0,85%)

De las genoespecies de *Borrelia* pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* s.l., *B. lusitaniae* fue la menos prevalente y se halló únicamente en la zona de montaña, donde los porcentajes de infección fueron similares a los encontrados para otras genoespecies de *Borrelia*. Esta genoespecie se encuentra principalmente relacionada con la presencia de determinadas especies de lagartos (Dsouli *et al.*, 2006), por lo que su ausencia en la costa y centro podría deberse a la ausencia de reservorios adecuados en esas áreas.

En un estudio previo realizado por Vázquez-López *et al.* (2015) se comprobó que la incidencia anual de EL era mayor en la montaña (125,27/100.000 habitantes) que en la meseta (34,37/100.000 habitantes), lo que coincide con una mayor prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. en las garrapatas de esa zona.

Por el contrario, *B. miyamotoi* solamente se encontró en las zonas de montaña y costa, donde además presentó una mayor prevalencia (Tabla 4.16.), sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Además, se realizó una correlación de Spearman para conocer la posible asociación entre el número total de garrapatas recogidas por zona y estación y la prevalencia de *Borrelia* spp., constatándose que ambos factores no estaban correlacionados ($p > 0,05$). Esto nos indica que la prevalencia de *Borrelia* spp. no aumenta con el número de garrapatas activas en la zona de muestreo; sin embargo, esto puede estar directamente relacionado con el riesgo de transmisión de *Borrelia* spp. al ser humano, pues aunque el número de garrapatas infectadas sea proporcionalmente el mismo, el riesgo de picadura aumenta con el número de garrapatas presentes en una zona.

Las diferencias observadas en la prevalencia de las genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. pueden estar relacionadas con múltiples factores, entre los que destacan las características climáticas de la zona, la existencia de especies de garrapatas que sean adecuadas como vectores del patógeno estudiado, la presencia de reservorios adecuados, el uso de la tierra, la fragmentación del hábitat, etc.; así como, las posibles interrelaciones entre todos estos factores (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014). Por estos motivos el estudio de la población de hospedadores de la zona resulta muy interesante para comprender la dinámica de la infección por diferentes genoespecies de *Borrelia*, ya que se ha observado, por ejemplo, que la prevalencia de *B. garinii* es mayor en zonas de bosques de robles que de pinos, ya que los primeros son lugares más adecuados para el mantenimiento de poblaciones cérvidos y pequeños roedores que están relacionados con el mantenimiento de esta genoespecie y de las garrapatas que la

transmiten (Gray *et al.*, 1998; Ruyts *et al.*, 2017). Por el contrario en bosques de pinos son más abundantes las poblaciones de ardillas que son el reservorio más adecuado de *B. afzelii* (Pisanu *et al.*, 2014; Ruyts *et al.*, 2017). Aunque en Galicia no hay datos disponibles sobre las poblaciones de hospedadores que pueden actuar como reservorios de las distintas genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l., la montaña es la zona en la que los núcleos de población humana son más pequeños y dispersos, creando condiciones más adecuadas para el mantenimiento de las poblaciones de vectores y reservorios. De todos modos, para poder realizar un estudio de este tipo se deberían combinar las observaciones realizadas en el campo con otros estudios de laboratorio e incluso con modelos de correlación, lo que proporcionaría un mayor conocimiento de la epidemiología de los diferentes patógenos estudiados (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014).

4.2.4. *Rickettsia* spp.

4.2.4.1. Protocolos de PCR

Los genes *rOmpA*, *rOmpB* y *gltA* son los más adecuados para detectar e identificar las diversas especies de *Rickettsia* en garrapatas, aunque muestran valores de sensibilidad diferentes (Santibañez *et al.*, 2013); de este modo, en el estudio previamente citado se detectaron prevalencias del 92,6% con el *rOmpA*, del 88% con el *rOmpB* y del 85,1% con el *gltA* en garrapatas *Dermacentor* spp.

En la presente tesis, todas las garrapatas a las que se les había extraído el ADN se analizaron mediante PCR de los genes *rOmpA* y *rOmpB*; aquellas muestras positivas a alguno de estos dos genes, se procesaron también para el gen *gltA*.

En la Tabla 4.17. se incluye la prevalencia de *Rickettsia* spp. para los genes *rOmpA* y *rOmpB*, así como el porcentaje de garrapatas positivas a ambos genes (*rOmpA* + *rOmpB*) o a uno de los dos (*rOmpA/rOmpB*). Las diferencias en las prevalencias obtenidas mediante el estudio separado de los genes *rOmpA* y el *rOmpB* fueron notables, por lo que el porcentaje de garrapatas positivas a ambos

genes fue considerablemente menor al obtenido de forma individual (Tabla 4.17.); todo ello se tradujo en una concordancia débil entre ambas pruebas ($\kappa= 0,267$; $EE= 0,031$; $p< 0,001$). Sin embargo, el test McNemar mostró que no existían diferencias en la distribución de positivos y negativos obtenidos mediante ambos protocolos de PCR ($\chi^2= 0,0936$; $p= 0,75$).

Tabla 4.17. Prevalencia de *Rickettsia* spp. en función de los genes estudiados

	<i>rOmpA</i>	<i>rOmpB</i>	<i>rOmpA+</i> <i>rOmpB</i>	<i>rOmpA/rOmpB</i>
<i>I. acuminatus</i>	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>I. frontalis</i>	1/12 (8,33%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,33%)
<i>I. ricinus</i>	131/1.056 (12,41%)	136/1.056 (12,88%)	48/1.056 (4,55%)	219/1.056 (20,74%)
<i>D. marginatus</i>	18/19 (94,74%)	19/19 (100%)	18/19 (94,74%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	1/17 (5,88%)	4/17 (23,53%)	1/17 (5,88%)	4/17 (23,53%)

Al considerar el estadio de la garrapata, los resultados fueron muy variables (Tabla 4.18.). El estudio del gen *rOmpA* permitió detectar un mayor número de ninfas de *I. ricinus* positivas que el *rOmpB*; sin embargo, para las garrapatas adultas los mejores resultados se obtuvieron con este último gen. En *I. frontalis* y *D. reticulatus* las prevalencias fueron superiores para *rOmpA* y *rOmpB*, respectivamente, mientras que en *D. marginatus*, los resultados fueron similares con ambos genes. Además, se observó que únicamente el 15,07% de los *I. ricinus* positivos a *Rickettsia* spp. lo fueron para los tres genes estudiados y el 26,94% para dos de ellos, mientras que el 57,99% fueron positivos a un solo gen.

Debido a las discrepancias halladas entre ambos genes, las muestras positivas a los genes *rOmpA* o *rOmpB* se analizaron mediante una PCR que amplifica un fragmento del gen que codifica para la enzima citrato sintasa de *Rickettsia* spp. (*gltA*). Los mejores resultados se obtuvieron para *D. marginatus*, pues se detectó

amplificación en todas las muestras procesadas; así, el 94,74% de estas garrapatas fueron positivas a los tres genes y sólo el 5,26% a dos. Por su parte, todos los *D. reticulatus* positivos a *rOmpA* o *rOmpB* también lo fueron para el gen *gltA*, de forma que el 25% fueron positivos a los tres genes y el 75% sólo a dos genes. Por el contrario, el ejemplar de *I. frontalis* positivo al gen *rOmpA* fue negativo para el gen *gltA*.

Tabla 4.18. Prevalencia de *Rickettsia* spp. en función de los genes estudiados y el estadio de desarrollo de la garrapata

	Ninfas	Hembras	Machos	TOTAL
<i>rOmpA</i>				
<i>I. acuminatus</i>	-	-	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>I. frontalis</i>	1/12 (8,33%)	-	-	1/12 (8,33%)
<i>I. ricinus</i>	85/652 (13,04%)	28/202 (13,86%)	18/202 (8,91%)	131/1.056 (12,41%)
<i>D. marginatus</i>	-	15/15 (100%)	3/4 (75%)	18/19 (94,74%)
<i>D. reticulatus</i>	-	1/10 (10%)	0/7 (0%)	1/17 (5,88%)
<i>rOmpB</i>				
<i>I. acuminatus</i>	-	-	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>I. frontalis</i>	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)
<i>I. ricinus</i>	73/652 (11,20%)	29/202 (14,36%)	34/202 (16,83%)	136/1.056 (12,88%)
<i>D. marginatus</i>	-	15/15 (100%)	4/4 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	-	2/10 (20%)	2/7 (28,57%)	4/17 (23,53%)
<i>rOmpA+rOmpB</i>				
<i>I. acuminatus</i>	-	-	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>I. frontalis</i>	0/12 (0%)	-	-	0/12 (0%)
<i>I. ricinus</i>	29/652 (4,45%)	16/202 (7,92%)	3/202 (1,49%)	48/1.056 (4,55%)
<i>D. marginatus</i>	-	15/15 (100%)	3/4 (75%)	18/19 (94,74%)
<i>D. reticulatus</i>	-	1/10 (10%)	0/7 (0%)	1/17 (5,88%)
<i>rOmpA/rOmpB</i>				
<i>I. acuminatus</i>	-	-	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>I. frontalis</i>	1/12 (8,33%)	-	-	1/12 (8,33%)
<i>I. ricinus</i>	129/652 (19,79%)	41/202 (20,30%)	49/202 (24,26%)	219/1.056 (20,74%)
<i>D. marginatus</i>	-	15/15 (100%)	4/4 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	-	2/10 (20%)	2/7 (28,57%)	4/17 (23,53%)

Cuando los *I. ricinus* positivos a las otras PCR se analizaron para la *gltA* (Tabla 4.19.), se observó que el 40,46% y el 41,91% de los positivos al gen *rOmpA* y *rOmpB*, respectivamente, lo fueron también al gen *gltA*. Todo ello se tradujo en una concordancia leve, pues el estadístico kappa (κ) fue de 0,01 (EE= 0,06; $p= 0,026$) y 0,16 (EE=

0,003; $p=0,059$) cuando se compararon los resultados para la *gltA* con los obtenidos para el *rOmpA* y el *rOmpB*, respectivamente. Además, mediante la aplicación de un test McNemar se constató que existían diferencias en la distribución de positivos y negativos al comparar los resultados para la *gltA* con los obtenidos para el gen *rOmpA* ($\chi^2=27,539$; $p<0,01$) y *rOmpB* ($\chi^2=33,153$; $p<0,01$).

Tabla 4.19. Número de *I. ricinus* positivas a *Rickettsia* spp. en cada estadio de desarrollo al considerar cada uno de los genes estudiados

		<i>rOmpA</i> ⁺	<i>rOmpB</i> ⁺	<i>gltA</i> ⁺
Ninfas + (N= 129)	<i>rOmpA</i>	-	29/73 (39,73%)	34/48 (70,83%)
	<i>rOmpB</i>	29/85 (34,12%)	-	35/48 (72,92%)
	<i>gltA</i>	34/85 (40%)	35/73 (47,95%)	-
Hembras + (N= 41)	<i>rOmpA</i>	-	16/29 (55,17%)	16/22 (72,73%)
	<i>rOmpB</i>	16/28 (57,14%)	-	18/22 (81,82%)
	<i>gltA</i>	16/28 (57,14%)	18/29 (62,07%)	-
Machos + (N= 49)	<i>rOmpA</i>	-	3/34 (8,82%)	3/7 (42,86%)
	<i>rOmpB</i>	3/18 (16,67%)	-	4/7 (57,14%)
	<i>gltA</i>	3/18 (16,67%)	4/34 (11,76%)	-
TOTAL + (N= 219)	<i>rOmpA</i>	-	48/136 (35,29%)	53/77 (68,83%)
	<i>rOmpB</i>	48/131 (36,64%)	-	57/77 (74,03%)
	<i>gltA</i>	53/131 (40,46%)	57/136 (41,91%)	-

Los resultados obtenidos revelan que las discrepancias entre los tres genes son menores cuando la detección de este patógeno se realiza en las especies de *Dermacentor*. Por el contrario, en las especies de *Ixodes*, la elevada variabilidad presente en los resultados no permite determinar que gen (*rOmpA* o *rOmpB*) presenta una mayor sensibilidad. Sin embargo, estos resultados demuestran que la mayor sensibilidad se obtiene procesando todas las muestras mediante, al menos, dos protocolos de PCR, como ya se había indicado previamente (Santibañez *et al.*, 2013). Aunque en la mayoría de artículos publicados sobre la prevalencia de *Rickettsia* spp. en garrapatas las muestras se analizan para más de un gen, normalmente el segundo gen empleado se utiliza exclusivamente para confirmar los positivos al primer gen. Nuestros resultados demuestran que este

procedimiento podría generar un considerable número de falsos negativos.

4.2.4.2. Prevalencia total

Para el estudio de prevalencia, se consideraron positivas aquellas muestras en las que se obtuvo amplificación para, al menos, uno de los genes (*rOmpA/rOmpB*). Así, la prevalencia de *Rickettsia* spp. hallada en las garrapatas del género *Dermacentor*, fue notable pues se detectó ADN de este patógeno en el 100% de los *D. marginatus* (19/19) y el 23,53% de los *D. reticulatus* (4/17). Los porcentajes de infección fueron inferiores en el género *Ixodes*, resultando positivos el 20,74% de los ejemplares de *I. ricinus* (219/1.056) y el 8,33% (1/12) de los *I. frontalis*. El único ejemplar de *I. acuminatus* resultó negativo a ambos protocolos de PCR.

Las prevalencias de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* fueron superiores a las halladas en el noreste de España (13%) por Toledo *et al.* (2009). En otros países europeos se han señalado prevalencias que oscilaron entre el 1 y el 16,78%, siendo estas últimas similares a la observada en nuestro estudio (Kantsø *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2011; Lommano *et al.*, 2012; Wallménus *et al.*, 2012; Reye *et al.*, 2013; Rymaszewska y Piotrowski, *et al.*, 2013; Spitalská *et al.*, 2014; Venclikova *et al.*, 2014; Katargina *et al.*, 2015; Quarsten *et al.*, 2015; Schötta *et al.*, 2017). Sin embargo, en otros países como Portugal, Alemania e Italia se obtuvieron prevalencias superiores al 30%, siendo mayores a las detectadas en este trabajo (Milhano *et al.*, 2010; May y Strube, 2014; Castro *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en Italia por Tomassone *et al.* (2013), el 28,57% (n= 28) y el 100% (n= 2) de los *I. acuminatus* recogidos de un gato y una perdiz, respectivamente, resultaron positivos a *R. helvetica*. Este mismo patógeno se ha detectado en larvas de *I. frontalis* recogidas de aves procedentes de Países Bajos (Heylen *et al.*, 2017) con prevalencias del 5,3% (3/56). Sin embargo, la capacidad vectorial de ambas especies de garrapatas todavía se desconoce pues los

estudios al respecto son escasos y, además, analizan un reducido número de especímenes (Estrada-Peña, 2017).

Con respecto a la prevalencia detectada en *Dermacentor* spp., Svehlová *et al.* (2014) observaron que el 11% de los *D. reticulatus* recolectados en Eslovaquia eran positivos a *Rickettsia* spp., prevalencia inferior a la observada en este estudio; sin embargo, se encontraron prevalencias superiores (>30%) en Bielorrusia y Polonia (Reye *et al.*, 2013; Zajac *et al.*, 2017), así como en un estudio realizado en el centro de España (Toledo *et al.*, 2009). La prevalencia hallada en *D. marginatus* fue superior a la encontrada previamente en Italia (24,3%; Selmi *et al.*, 2017) y en el centro de España (60%; Toledo *et al.*, 2009). No obstante, es necesario señalar que en la mayoría de estos estudios sólo se analizan un reducido número de ejemplares de *Dermacentor* spp., por lo que una pequeña variación en el número de positivos pueden alterar notablemente la prevalencia total.

Aunque, en general, la prevalencia de *Rickettsia* spp. es superior en garrapatas del género *Dermacentor* que en *Ixodes* spp., existen marcadas diferencias regionales, que podrían deberse a la interacción de otras variables como el número de garrapatas procesadas, la época del año en el que se recogieron las garrapatas y la presencia de hospedadores adecuados para la bacteria en la zona; además, como se señaló en el apartado anterior, debería considerarse el protocolo de PCR empleado como una variable más.

4.2.4.3. Especies y prevalencia

El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar 4 especies de *Rickettsia*: *R. raoultii*, *R. monacensis*, *R. slovaca* y *R. felis*, así como la especie no cultivada *Candidatus R. rioja*. Además, el 5,96% de las muestras positivas al gen *rOmpA* (9/151) y el 9,43% de las positivas al *rOmpB* (15/159) no pudieron identificarse molecularmente debido a la baja concentración del producto de PCR. Cuando alguna de las garrapatas en las que se detectó *Rickettsia* spp. fue positiva para más de un gen, siempre se identificó la misma

especie de *Rickettsia*. No obstante, es importante indicar que la secuencia proporcionada por el gen *rOmpB* no permite identificar de forma fiable algunas especies de *Rickettsia*, como *Ca. R. rioja* y *R. raoultii* (Santibañez *et al.*, 2013), por lo que, en aquellas garrapatas que sólo fueron positivas para este gen, se optó por establecer una categoría denominada *R. raoultii/Ca. R. rioja*. No se empleó el gen *gltA* para identificar las especies de *Rickettsia* ya que este no es adecuado para su identificación (Roux *et al.*, 1997).

El 97,9% y el 17,36% de las secuencias de *Rickettsia* spp. para el gen *rOmpA* y *rOmpB*, respectivamente, mostraron una homología del 100% con respecto a las depositadas en el GenBank (Tabla 4.20.).

En el caso de presentar discrepancias, éstas oscilaron entre 1 y 5 polimorfismos de un solo nucleótido. Las secuencias de referencia correspondieron a especies de *Rickettsia* detectadas en garrapatas de España y de otros países europeos y asiáticos, a excepción de las correspondientes a *R. felis* que se obtuvieron a partir de varios ejemplares de *Ctenocephalides felis* (*rOmpA*) y de sangre de un perro en Italia (*rOmpB*). Muchas de las secuencias de *R. raoultii*, *Ca. R. rioja* y *R. slovaca* obtenidas en *I. ricinus* y *Dermacentor* spp., especialmente *D. marginatus*, fueron idénticas entre sí; este hecho ya se había observado previamente para la especie *R. raoultii* (Stańczak *et al.*, 2018).

Las secuencias que presentaron mutaciones con respecto a las incluidas en el GenBank se depositaron en esta base de datos bajo los números de acceso comprendidos entre el MK301593 y el MK301607.

Tabla 4.20. Número y especie de garrapata en las que se detectaron diferentes especies de *Rickettsia*, número de garrapatas infectadas, número de acceso de la secuencia de referencia y porcentaje de identidad con respecto a la misma

	Nº garrapatas	Nº acceso	Identidad (%)	Nuevo Nº acceso
Gen de la proteína externa de membrana A (<i>rOmpA</i>)				
<i>R. felis</i> (n=1)	1 lr	KY913651	100	
<i>R. monacensis</i> (n=8)	3 lr	MG432690	100	
	3 lr	LN794217	100	
	1 lr	LN794217	100	
	1 lr	KF016137	100	
<i>R. raoultii</i> (n=24)	3 lr	KX506737	100	
	6 lr, 2 Dm	MF383598	100	
	4 lr	MG662380	100	
	7 lr; 2 Dm	MF166732	100	
<i>Ca. R. rioja</i> (n=71)	9 lr; 4 Dm	EF028201	100	
	3 lr	EF028201	99	MK301593- MK301595
	44 lr; 9 Dm; 1 Dr; 1 lf	GQ404429	100	
<i>R. slovacica</i> (n=38)	34 lr; 1 Dm	MF379311	100	
	2 lr	JX972173	100	
	1 lr	KX506735	100	
No identificadas (n=9)	9 lr	-	-	
Gen de la proteína externa de membrana B (<i>rOmpB</i>)				
<i>R. felis</i> (n=1)	1 lr	MG451836	99	MK301596
<i>R. monacensis</i> (n=13)	4 lr	KU961543	100	
	9 lr	KU961543	99	MK301597
<i>R. raoultii</i> / <i>Ca. R. rioja</i> (n=93)	52 lr; 14 Dm; 3 Dr	HQ232278	99	MK301598
	7 lr; 2 Dm	KU310593	100	
	5 lr; 1 Dm	KJ663752	100	
	7 lr; 1 Dm	KJ663752	99	MK301599
	1 lr	KC847318	100	
<i>R. slovacica</i> (n=37)	5 lr	CP003375	100	
	30 lr; 1 Dm; 1 Dr	CP003375	99	MK301600- MK30607
No identificadas (n=15)	15 lr	-	-	
Gen de la citrato sintasa (<i>glTA</i>)				
<i>R. felis</i> (n=0)		-		
<i>R. monacensis</i> (n=2)	2 lr	KU586332	100	
<i>R. raoultii</i> / <i>R. slovacica</i> / <i>Ca. R. rioja</i> (n=8)	2 lr; 3 Dm; 2 Dr	MF002529	100	
	1 lr	KY474576	100	

lr: *I. ricinus*; lf: *I. frontalis*; Dm: *D. marginatus*; Dr: *D. reticulatus*

Para el gen *rOmpA* las únicas secuencias que presentaron mutaciones con respecto a las de referencia correspondieron a *Ca. R. rioja*. Todas ellas se obtuvieron a partir de *I. ricinus*, y presentaron 3 (453/456 pb; 502/505 pb) y 4 (493/497 pb) polimorfismos con respecto a la secuencia EF028201 (Tabla 4.20). Por el contrario, las secuencias obtenidas para el gen *rOmpB* presentaron muchas más discrepancias y con frecuencia se observaron numerosas muestras que presentaban la misma mutación. Las mayores discrepancias correspondieron a *R. raoultii*/*Ca. R. rioja*, pues 69 secuencias mostraron de 1 a 5 polimorfismos de un solo nucleótido con respecto al aislado HQ232278, con mutaciones que se repitieron frecuentemente, siendo la transversión TxA la presente en la mayoría de las muestras; además, en las secuencias de mayor longitud, esta mutación se acompañó de otra transición CxT y 2 transversiones AxC. Además, 5 secuencias de *R. raoultii*/*Ca. R. rioja* mostraron la misma transición CxT con respecto a la secuencia de referencia KJ663752, mientras que las otras 3 mostraron mutaciones diferentes. En el caso de *R. monacensis*, 9 de las secuencias mostraron la misma transición TxC con respecto a la secuencia KU961543.

Las secuencias obtenidas para los genes *rOmpA* y *rOmpB* se emplearon para realizar un árbol filogenético (Figuras 4.13. y 4.14.); aunque las muestras positivas a *gltA* se secuenciaron, este gen no se empleó para identificar ni para realizar un árbol filogenético pues no permite caracterizar de forma fiable las especies de *Rickettsia*.

Para el gen *rOmpA* (Figura 4.13.) se observó que *R. slovacae*, *R. monacensis* y *R. felis* forman una rama claramente separada del resto de las especies de *Rickettsia*, especialmente en el caso de *R. felis*.

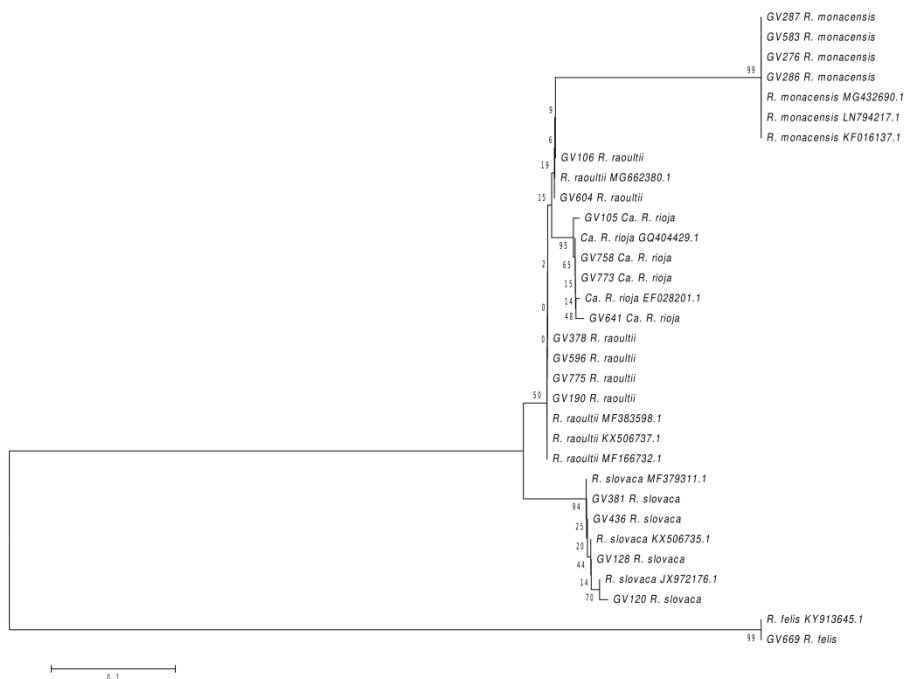


Figura 4.13. Árbol filogenético obtenido mediante las secuencias del gen *rOmpA* de *Rickettsia* spp. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

Por el contrario, la diferenciación de *R. raoultii* y *Ca. R. rioja* es menos clara. Para este gen, ambas especies se diferencian en muy pocos pares de bases, de manera que las especies de *Ca. R. rioja* forman, junto a sus secuencias de referencia, una subrama dentro de *R. raoultii*.

Como se señaló anteriormente, el gen *rOmpB* no permite la identificación fiable de ciertas especies de *Rickettsia*, lo que se demuestra al observarse diferentes aislados de *R. raoultii* y *Ca. R. rioja* integrados en un mismo grupo (Figura 4.14.). Para la realización de este árbol filogenético se incluyeron las identificaciones obtenidas mediante el estudio del gen *rOmpA* en aquellas muestras en las que estaba disponible.

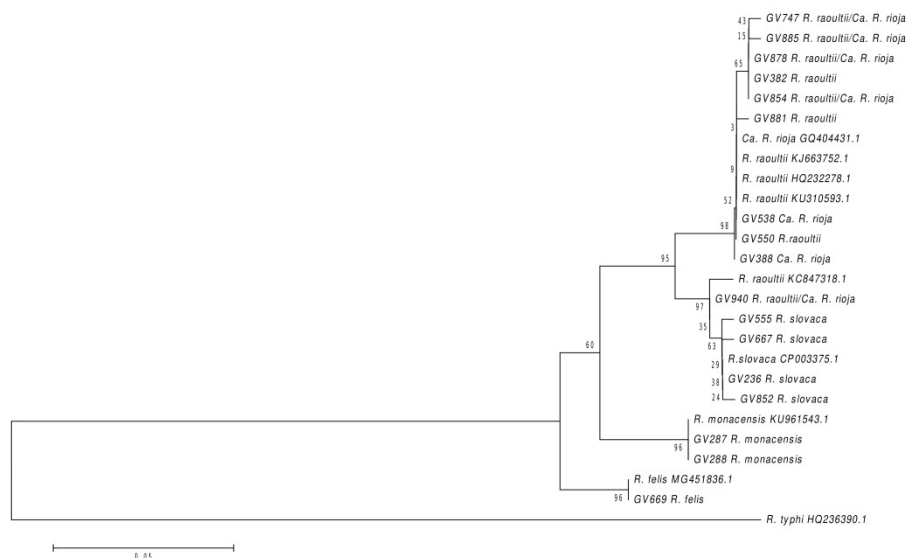


Figura 4.14. Árbol filogenético obtenido mediante las secuencias del gen *rOmpB* de *Rickettsia* spp. El árbol se construyó mediante el análisis *Neighbour Joining*. Los números mostrados en los nodos indican los valores de bootstrap (1.000 repeticiones)

También se comprobó que *R. felis* y *R. monacensis* se localizaban en ramas claramente diferenciadas a las ocupadas por otras especies de *Rickettsia*; por el contrario, las secuencias de *R. slovaca* se situaron próximas a las de *R. raoultii*/*Ca. R. rioja*. De hecho, una secuencia muy similar (GV940; 375/376 pb) al aislado KC847318 de *R. raoultii* se situó más cerca de las secuencias de *R. slovaca* que de las *R. raoultii*/*Ca. R. rioja*. Sin embargo, la garrapata de la que se obtuvo esta secuencia resultó negativa para el gen *rOmpA*, por lo que no se pudo profundizar en su identificación; por ello, esta secuencia se identificó finalmente como *R. raoultii*/*Ca. R. rioja*.

En la Tabla 4.21. se resume la prevalencia de las distintas especies de *Rickettsia* en las garrapatas examinadas mediante el estudio de ambos genes (*rOmpA*/*rOmpB*). Si consideramos el número total de garrapatas positivas se observó que *R. slovaca* y *Ca. R. rioja* fueron las especies de *Rickettsia* más prevalentes, seguidas de *R.*

raoultii/Ca. *R. rioja* y *R. raoultii*. *Rickettsia monacensis* fue una especie poco prevalente, mientras que *R. felis* solamente se detectó en un ejemplar de *I. ricinus*. Las especies identificadas en *I. ricinus* fueron, en orden decreciente, *R. slovacica*, Ca. *R. rioja*, *R. raoultii*/ Ca. *R. rioja*, *R. raoultii*, *R. monacensis* y *R. felis*; en *D. marginatus*: Ca. *R. rioja*, *R. raoultii* y *R. slovacica* y *R. raoultii*/ Ca. *R. rioja* y en *D. reticulatus*, *R. raoultii*/ Ca. *R. rioja* y Ca. *R. rioja* y *R. slovacica*.

Tabla 4.21. Prevalencia de las distintas especies de *Rickettsia* en las garrapatas procesadas

	<i>I. ricinus</i>	<i>I. frontalis</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>D. reticulatus</i>
rOmpA/rOmpB				
<i>R. felis</i>	1/1.056 (0,09%)	0/12 (0%)	0/19 (0%)	0/17 (0%)
<i>R. monacensis</i>	14/1.056 (1,33%)	0/12 (0%)	0/19 (0%)	0/17 (0%)
<i>R. raoultii</i>	20/1.056 (1,89%)	0/12 (0%)	4/19 (21,05%)	0/17 (0%)
Ca. <i>R. rioja</i>	56/1.056 (5,30%)	1/12 (8,33%)	13/19 (68,42%)	1/17 (5,88%)
<i>R. raoultii</i> /Ca. <i>R. rioja</i> /	40/1.056 (3,79%)	0/12 (0%)	1/19 (5,26%)	2/17 (11,76%)
<i>R. slovacica</i>	69/1.056 (6,53%)	0/12 (0%)	1/19 (5,26%)	1/17 (5,88%)
No identificadas	19/1.056 (1,80%)	0/12 (0%)	0/19 (0%)	0/17 (0%)
TOTAL	219/1.056 (20,74%)	1/12 (8,33%)	19/19 (100%)	4/17 (23,53%)

En todas las especies de garrapatas estudiadas se identificaron *R. raoultii*, *R. slovacica* y Ca. *R. rioja*, que son los principales agentes causales del síndrome conocido como TIBOLA/DEBONEL. Este síndrome, como se señaló en el apartado 1.2.4.1. de los Antecedentes, es una de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas con mayor prevalencia en Europa (Oteo y Portillo, 2012). *Candidatus R. rioja* no se ha podido cultivar hasta la fecha y solo se ha detectado en *D. marginatus* extraídas de pacientes con SENLAT y en los propios

pacientes en estudios realizados en España y Francia (Portillo *et al.*, 2009; Socolovschi *et al.*, 2009).

Aunque *R. raoultii*, *R. slovaca* y *Ca. R. rioja* se detectaron en la mayoría de las especies de garrapatas estudiadas, su transmisión se asocia principalmente con *D. marginatus*, aunque *D. reticulatus* también se considera un vector de estos patógenos. Ambas especies de garrapatas muestran prevalencias superiores al 40% en la mayoría de países europeos (Fernandez-Soto *et al.*, 2006; Dobec *et al.*, 2009; Milhano *et al.*, 2010; Spitalska *et al.*, 2012; Reye *et al.*, 2013). La identificación de *R. raoultii* y *R. slovaca* en *I. ricinus* de Galicia es sorprendente pues, aunque esta no es la primera vez que se detectan en estos ixódidos, su hallazgo es generalmente ocasional. Según diversos autores (Chmielewski *et al.*, 2009; Reye *et al.*, 2013) estas especies de *Rickettsia* pueden detectarse en *I. ricinus* cuando esta garrapata se halla en zonas donde sus poblaciones y las de *Dermacentor* spp. se presentan de forma simpátrica. En los trabajos antes citados, en *I. ricinus* se detectaron prevalencias que oscilaron entre el 2,6% y el 65,4% para *R. raoultii* y del 0,94% para *R. slovaca*. Además, en un estudio reciente realizado en Polonia (Stańczak *et al.*, 2018), se comprobó que un 15,4% de los *I. ricinus* procesados fueron positivos a *R. raoultii* y que, además, las secuencias obtenidas para estas garrapatas eran idénticas a las obtenidas de *D. marginatus*. No obstante, todavía se desconoce cuál es el papel que desempeña *I. ricinus* en la transmisión de estas especies de *Rickettsia*, ya que todavía no se ha determinado si podría actuar como vector o como reservorio (Boldis y Spitalská, 2010).

La prevalencia de *R. monacensis* en *I. ricinus* (1,33%) fue similar a la señalada por diversos autores (Silaghi *et al.*, 2008; Elfving *et al.*, 2010) en Alemania y Suecia, aunque fue inferior a la detectada en otras zonas de España (Márquez, 2008) y a la señalada en otros estudios (Floris *et al.*, 2008; Radulović *et al.*, 2011; Tijssse-Klasen *et al.*, 2011; Gargili *et al.*, 2012) realizados en Italia, Turquía, Países Bajos y Serbia con prevalencias que oscilaban desde el 4,5% al 34,6%. Esta especie y *R. felis* pertenecen al grupo de especies de

Rickettsia que originan las fiebres manchadas. Aunque el principal vector de *R. felis* son pulgas *Ctenocephalides felis*, también se ha detectado de forma ocasional en ixódidos como *I. ovatus* y *R. sanguineus* (Parola, 2011), así como en *I. ricinus* de Alemania (Dobler y Wölfel, 2009).

En el presente estudio no hemos detectado *R. helvetica*, aunque en otras zonas de España (Márquez y Millan, 2009) se hallaron prevalencias del 2,7% en *I. ricinus* y, en otros países europeos, se han citado prevalencias que oscilan entre el 0,5% y el 66% (Floris *et al.*, 2008; Silaghi *et al.*, 2008; Boretti *et al.*, 2009; Sprong *et al.*, 2009; Franke *et al.*, 2010; Severinsson *et al.*, 2010; Radulović *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la presencia de *Rickettsia* spp. en garrapatas son de gran interés especialmente por la elevada prevalencia de ciertas especies de esta bacteria en *D. marginatus* y *D. reticulatus*, que pueden suponer un riesgo para la salud pública.

Por otro lado, sería importante tener en cuenta el posible riesgo que supone que una de las garrapatas mayoritarias en la zona de estudio (*I. ricinus*) presente unos valores de prevalencia de *Rickettsia* spp. tan elevados a pesar de que en algunos casos se desconozca su papel como vector.

4.2.4.4. Dinámica de infección

La influencia del estadio de las garrapatas sobre la prevalencia de infección por estos patógenos solo se pudo establecer en *I. ricinus*, ya que fue la única especie recogida en la que todos sus estadios presentan un comportamiento exófilo, y por tanto se pueden capturar mediante bandereo. De este modo, se comprobó que la prevalencia de *Rickettsia* spp. fue ligeramente superior en los adultos (Tabla 4.22.), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Tabla 4.22. Prevalencia de *Rickettsia* spp. en los distintos estadios de desarrollo

	Ninfas	Hembras	Machos	TOTAL
<i>I. ricinus</i>	129/652 (19,79%)	41/202 (20,30%)	49/202 (24,26%)	219/1056 (20,74%)
<i>I. frontalis</i>	1/12 (8,33%)	-	-	1/12 (8,33%)
<i>D. marginatus</i>	-	15/15 (100%)	4/4 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	-	2/10 (20%)	2/7 (28,57%)	4/17 (23,53%)

Estos resultados coinciden con los hallados por otros autores que también observaron prevalencias más elevadas de *Rickettsia* spp. en adultos que en ninfas, sin ser significativas (May and Strube, 2014; Spitalská *et al.*, 2014; Venclikova *et al.*, 2014; Katargina *et al.*, 2015). Como la transmisión de *Rickettsia* spp. en las garrapatas es transovárica y transestadial, estos artrópodos pueden mantener la infección sin necesidad de alimentarse de hospedadores infectados (Rizzoli *et al.*, 2014) lo que podría explicar la ausencia de diferencias significativas en la prevalencia al considerar los estadios de desarrollo.

Al analizar la posible influencia del año de muestreo (Tabla 4.23.), se comprobó que la prevalencia en *I. ricinus* fue significativamente más elevada ($\chi^2 = 22,498$; $p < 0,001$) durante el segundo año (26,82%) que durante el primero (14,79%), lo que podría deberse a que la prevalencia de esta bacteria en las garrapatas de las zonas estudiadas se encuentre en aumento.

Tabla 4.23. Prevalencia de *Rickettsia* spp. en función del año de muestreo

	Año 1	Año 2	TOTAL
<i>I. ricinus</i>	79/534 (14,79%)	140/522 (26,82%)	219/1.056 (20,74%)
<i>I. frontalis</i>	1/5 (20%)	0/7 (0%)	1/12 (8,33%)
<i>D. marginatus</i>	14/14 (100%)	5/5 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	3/12 (25%)	1/5 (20%)	4/17 (23,53%)

Cuando se analizó el efecto de la estación del año en la que se capturaron las garrapatas (Tabla 4.24.), se observó que la prevalencia de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* era significativamente menor ($\chi^2 =$

44,805; $p < 0,001$) en verano (8,88%) que en otras estaciones del año. Las diferencias encontradas entre la primavera y el invierno también resultaron significativas ($\chi^2 = 12,303$; $p < 0,001$). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Barandika *et al.* (2008) en el norte de España, donde la prevalencia de *Rickettsia* spp. en *D. reticulatus* era mayor durante el otoño y el invierno, aunque en este estudio estas diferencias no fueron significativas; sin embargo, estos autores no encontraron *I. ricinus* positivas a *Rickettsia* spp., lo que impidió estudiar su prevalencia durante las distintas estaciones. No se estudió el efecto de la estación del año sobre las garrapatas *Dermacentor* ya que estas solamente se capturaron en los meses donde la temperatura fue menor.

Tabla 4.24. Prevalencia de *Rickettsia* spp. al considerar la estación de muestreo

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	TOTAL
<i>I. ricinus</i>	86/437 (19,68%)	23/259 (8,88%)	41/148 (27,70%)	69/212 (32,55%)	219/1.056 (20,74%)
<i>I. frontalis</i>	0/2 (0%)	-	1/4 (25%)	0/6 (0%)	1/12 (8,33%)
<i>D. marginatus</i>	9/9 (100%)	-	1/1 (100%)	9/9 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	2/5 (40%)	-	1/6 (16,67%)	1/6 (16,67%)	4/17 (23,53%)

En la Figura 4.15. se muestra la distribución temporal de las especies de *Rickettsia*; los datos obtenidos revelan la ausencia de un patrón estacional. También se comprobó la ausencia de relación entre la prevalencia de *Rickettsia* spp. y el número total de *I. ricinus* al considerar la zona y estación del año ($p > 0,05$).

Todo ello indica que la prevalencia de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* no se incrementa con el número de garrapatas activas en la zona de muestreo. Sin embargo, y al igual que ocurre con *Borrelia* spp., esto puede estar directamente relacionado con el riesgo de transmisión de *Rickettsia* spp. al ser humano ya que, aunque el número de garrapatas infectadas sea proporcionalmente el mismo, el riesgo de picadura aumenta con el número de garrapatas activas en una zona.

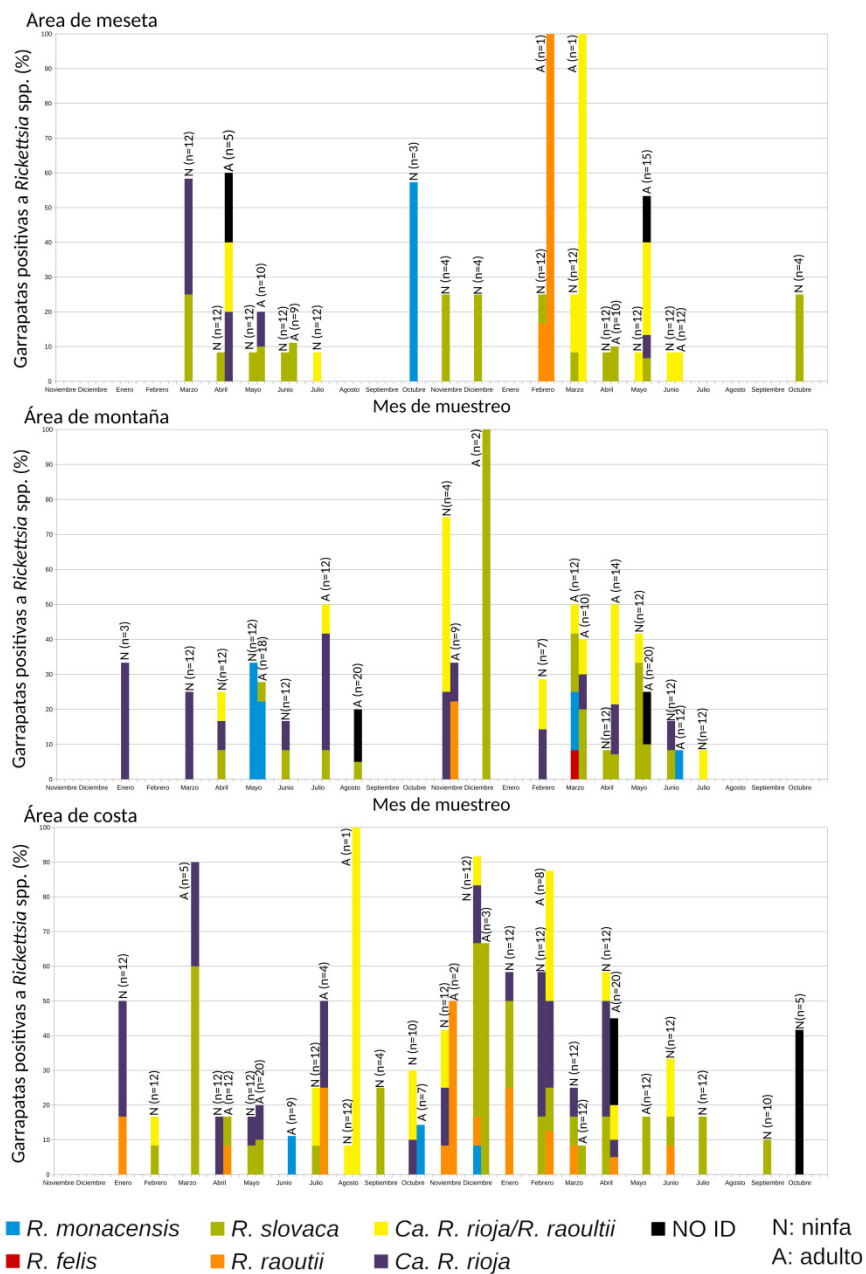


Figura 4.15. Prevalencia mensual de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* en las tres áreas de muestreo

Respecto a la influencia de la zona de muestreo (Tabla 4.25.), la prevalencia de *Rickettsia* spp. fue significativamente más elevada en los *I. ricinus* capturados en la costa (26,21%) que en los de la meseta (15,81%; $\chi^2 = 9,7146$; $p = 0,002$) y en los de la montaña (18,28%; $\chi^2 = 6,6201$; $p = 0,010$).

Tabla 4.25. Prevalencia de *Rickettsia* spp. según la zona de muestreo

	Meseta	Montaña	Costa	TOTAL
<i>rOmpA/rOmpB</i>				
<i>I. ricinus</i>	43/272 (15,81%)	68/372 (18,28%)	108/412 (26,21%)	219/1.056 (20,74%)
<i>I. frontalis</i>	0/8 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/12 (8,33%)
<i>D. marginatus</i>	-	12/12 (100%)	7/7 (100%)	19/19 (100%)
<i>D. reticulatus</i>	4/17 (23,53%)	-	-	4/17 (23,53%)

Nuestros resultados difieren con los hallados por Spitalská *et al.* (2014) en Eslovaquia, quienes no observaron diferencias significativas en la prevalencia de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* recogidas en diferentes áreas de estudio. Sin embargo, se han detectado notables diferencias en la prevalencia entre regiones de un mismo país; así en Alemania la prevalencia osciló entre el 12,3% al 30,1% (Silaghi *et al.*, 2011), entre el 2,6% al 24,5% en Suiza (Oechslin *et al.*, 2017) y entre el 9,5% al 10% en Suecia (Wallménus *et al.*, 2012). Por lo tanto se puede considerar que, al igual que ocurre con otras enfermedades transmitidas por vectores, la distribución del patógeno depende de múltiples variables, lo que puede originar notables diferencias en la prevalencia de una zona a otra.

No se pudo analizar la posible influencia de la zona sobre la prevalencia de *Dermacentor* spp. debido a que solo se capturaron ejemplares de *D. reticulatus* en la meseta y de *D. marginatus* en la montaña y en la costa.

4.2.5. Coinfecciones

De todas las especies de garrapatas procesadas, solamente se identificó más de un género de los patógenos estudiados en *I. ricinus* e *I. frontalis*. Así, el 32,67% de los *I. ricinus* analizados (345/1.056) presentaron al menos uno de los agentes patógenos, detectándose todos los patógenos incluidos en este estudio. En las 12 ninfas de *I. frontalis* procesadas se halló un positivo a *A. phagocytophilum* y otro a *Ca. R. rioja* (16,67%). Las especies de *Dermacentor* spp. solamente fueron positivas a *Rickettsia* spp. y no se detectó ningún patógeno en el único ejemplar hallado de *I. acuminatus*.

Únicamente se encontraron coinfecciones por distintos géneros de patógenos en *I. ricinus*. De este modo, un 3,31% de las garrapatas (35/1.056) estaban infectadas con más de un patógeno, lo que corresponde al 10,14% de las garrapatas positivas (35/345). En un estudio previo realizado en Austria por Schötta *et al.* (2017) se observó que la prevalencia de infecciones múltiples en *I. ricinus* era del 17,0% de las garrapatas positivas (7,2% del total), muy superior a la observada en este trabajo. En ese trabajo, sin embargo, gran parte de las coinfecciones se debieron a la asociación *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, no detectado en este estudio, con otro patógeno.

Dentro de las infecciones mixtas, las integradas por dos patógenos fueron las más frecuentes (97,14%; 34/35), mientras que solo se encontró un caso de infección por tres agentes (2,86%; 1/35). Este último caso se trató de una hembra de *I. ricinus* recogida en la montaña durante el verano del primer año de muestreo que resultó positiva a *B. miyamotoi*, *B. garinii* y *Ca. R. rioja*. En las infecciones dobles, los dos agentes patógenos más prevalentes en *I. ricinus*, *Borrelia burgdorferi* s.l. y *Rickettsia*, fueron también los más frecuentemente asociados. De este modo, el 67,65% de las garrapatas con infecciones dobles (23/34) presentaron coinfecciones por *Borrelia burgdorferi* s.l. y *Rickettsia*. Las coinfecciones identificadas en *I. ricinus* se resumen en la Tabla 4.26.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Schötta *et al.* (2017) en Austria, donde la coinfección más frecuente en *I. ricinus* fue

Borrelia burgdorferi s.l. + *Rickettsia* (59% de las coinfecciones), seguida de *Borrelia burgdorferi* s.l. + *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis (14% de las coinfecciones); los dos patógenos más prevalentes en *I. ricinus* fueron los que se encontraron asociados con mayor frecuencia, siendo similar a lo observado en nuestro estudio.

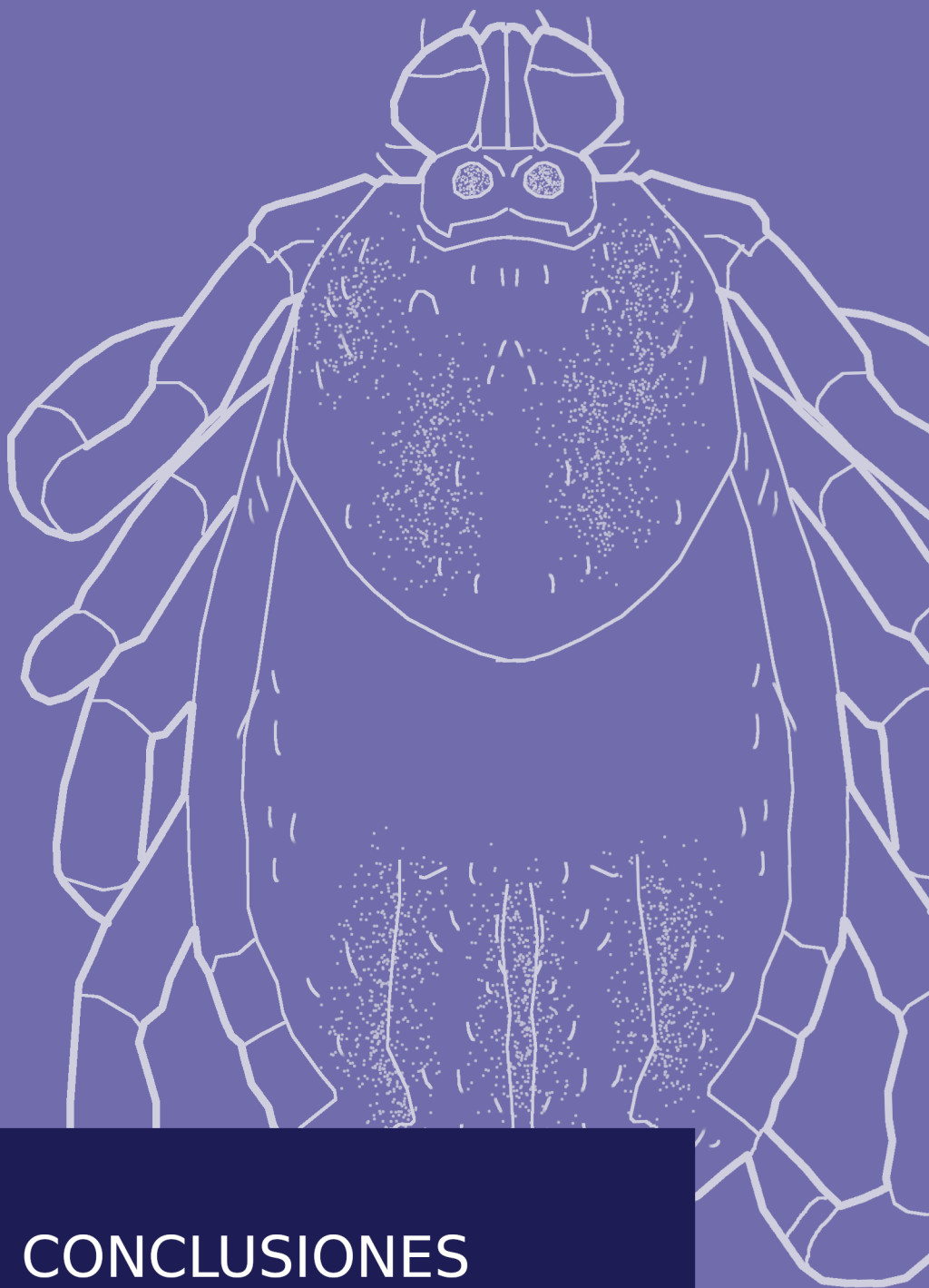
Tabla 4.26. Coinfecciones detectadas en *I. ricinus*

	TOTAL
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>Rickettsia</i> spp.	23
<i>B. afzelii</i> + <i>R. monacensis</i>	3
<i>B. afzelii</i> + <i>R. raoultii</i>	1
<i>B. afzelii</i> + <i>Ca. R. rioja</i>	2
<i>B. afzelii</i> + <i>R. raoultii</i> / <i>Ca. R. rioja</i>	3
<i>B. afzelii</i> + <i>R. slovacae</i>	2
<i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> no identificada	1
<i>B. burgdorferi</i> s.l. + <i>R. raoultii</i> / <i>Ca. R. rioja</i>	1
<i>B. garinii</i> + <i>Ca. R. rioja</i>	2
<i>B. garinii</i> + <i>R. raoultii</i> / <i>Ca. R. rioja</i>	1
<i>B. garinii</i> + <i>R. slovacae</i>	3
<i>B. lusitanae</i> + <i>R. monacensis</i>	1
<i>B. lusitanae</i> + <i>Ca. R. rioja</i>	1
<i>B. valaisiana</i> + <i>R. raoultii</i>	1
<i>B. valaisiana</i> + <i>R. slovacae</i>	1
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>B. miyamotoi</i>	3
<i>B. garinii</i> + <i>B. miyamotoi</i>	1
<i>B. valaisiana</i> + <i>B. miyamotoi</i>	2
<i>Rickettsia</i> + <i>B. miyamotoi</i>	2
<i>B. miyamotoi</i> + <i>Ca. R. rioja</i>	1
<i>B. miyamotoi</i> + <i>R. slovacae</i>	1
<i>Rickettsia</i> + <i>Babesia</i>	2
<i>Ca. R. rioja</i> + <i>B. venatorum</i>	1
<i>Rickettsia</i> no identificada + <i>B. venatorum</i>	1
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>Babesia</i>	2
<i>B. garinii</i> + <i>B. venatorum</i>	2
<i>Rickettsia</i> + <i>Theileria</i>	1
<i>R. slovacae</i> + <i>T. sp. OT3</i>	1
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>A. phagocytophilum</i>	1
<i>B. valaisiana</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	1
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>B. miyamotoi</i> + <i>Rickettsia</i>	1
<i>B. garinii</i> + <i>B. miyamotoi</i> + <i>Ca. R. rioja</i>	1

Se realizó un análisis para valorar el posible efecto de varias variables sobre el porcentaje de coinfecciones, observándose resultados similares a los obtenidos para *B. burgdorferi* s.l. De este modo, se observó que los adultos (4,70%; 19/404) presentaban un porcentaje de coinfecciones significativamente superior al de ninfas (2,45%; 16/652) ($\chi^2 = 10,194$; $p = 0,006$). Cuando los datos se analizaron en función de la zona de muestreo, se detectó un mayor número de coinfecciones en la zona de montaña (4,57%; 17/372) que en la meseta (1,10%; 3/272) y la costa (3,64%; 15/412) siendo estas diferencias también significativas ($\chi^2 = 6,118$; $p = 0,05$). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas con respecto a la estación o año de muestreo ($p > 0,05$).







CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se extraen las siguientes conclusiones:

1ª. El estudio morfológico y molecular permitió identificar 5 especies de ixódidos en la vegetación del noroeste de España, siendo *Ixodes ricinus* el más abundante, mientras que *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes frontalis* e *Ixodes acuminatus* solo se hallaron de forma ocasional.

2ª. *Ixodes ricinus* presentó un patrón de actividad unimodal, recogándose el mayor número de ejemplares a finales de primavera y principios de verano, especialmente en mayo, independientemente del estadio y la zona de muestreo. La dinámica poblacional no se pudo establecer para el resto de especies al carecer de un número suficiente de ejemplares.

3ª. La fenología de *I. ricinus* estuvo directamente asociada con la temperatura acumulada, el fotoperíodo y la temperatura máxima media, e inversamente relacionada con el aumento de la humedad relativa máxima media. Estas variables permiten predecir en qué épocas del año habrá mayor número de garrapatas en la vegetación y por tanto mayor riesgo de exposición y transmisión de los patógenos que vehiculan.

4ª. En *I. ricinus* se detectaron los 5 géneros de patógenos estudiados, siendo los más prevalentes *Rickettsia* spp. y *Borrelia* spp. y en menor proporción *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. y *Theileria* spp.; las coinfecciones fueron poco frecuentes y predominaron las ocasionadas por los dos primeros patógenos. En *I. frontalis* se detectó *Rickettsia* spp. y *Anaplasma* spp. En *D. marginatus* y *D. reticulatus*

únicamente se detectó *Rickettsia* spp., mientras que en *I. acuminatus* no se identificó ningún patógeno.

5ª. Un pequeño porcentaje de *I. ricinus* e *I. frontalis* estaban infectados con *Anaplasma phagocytophilum*, aunque mediante el estudio conjunto de los genes *groESL* y 16S *ARNr* se comprobó que la mayoría de las variantes halladas no son potencialmente zoonóticas.

6ª. En *I. ricinus* se detectaron bajas prevalencias de *Babesia venatorum* y *Babesia microti*, que potencialmente son patógenas para las personas. Así mismo, se halló *Theileria* sp. OT3 y, puesto que se desconoce cuál es su vector y patogenicidad, sería de gran interés realizar estudios más amplios para determinar el papel de esta garrapata en la transmisión de este patógeno.

7ª. Se identificaron 6 especies/genoespecies de *Borrelia* potencialmente zoonóticas: 5 del grupo *B. burgdorferi* sensu lato, relacionadas con la Enfermedad de Lyme (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. lusitaniae*), y una del grupo de las fiebres recurrentes (*B. miyamotoi*).

8ª. En todos los *D. marginatus* y en un elevado porcentaje de *D. reticulatus* se identificaron especies de *Rickettsia* (*R. slovaca* y *Candidatus R. rioja/R. raoultii*). Además, una elevada proporción de *I. ricinus* también resultaron positivos, identificándose 5 especies potencialmente zoonóticas: *R. raoultii*, *R. slovaca*, *Candidatus R. rioja*, *R. felis* y *R. monacensis*. No obstante, debido a que las 4 primeras especies están asociadas a otros vectores, se necesitan estudios más amplios para determinar la intervención de *I. ricinus* en el mantenimiento y transmisión de estas especies de *Rickettsia*.

9^a. La zona influyó significativamente sobre las prevalencias de *B. burgdorferi* s.l. y *Rickettsia* spp., siendo éstas significativamente superiores en *I. ricinus* procedentes de la montaña y costa, respectivamente.

10^a. Se constató que la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. y *Rickettsia* spp. no está relacionada con la densidad de *I. ricinus* en la vegetación; sin embargo, si hay un mayor número de garrapatas en determinadas épocas del año aumenta el riesgo de picadura y, por tanto, de transmisión de patógenos.

11^a. La mayoría de las especies y variantes de los microorganismos identificados en las garrapatas de la zona de estudio, a excepción de *B. burgdorferi* s.l., no están directamente implicados o se desconoce su importancia en la salud de los animales.

12^a. En el noroeste de España, la probabilidad de que las personas adquieran ciertas enfermedades transmitidas por garrapatas, especialmente borreliosis y rickettsiosis, es elevada, por lo que se debería concienciar a la población de los riesgos que entrañan las picaduras de garrapatas.

5. CONCLUSIONS

The following conclusions were drawn on the basis of the results of this study:

1st. The morphological and molecular study allowed the identification of 5 questing ixodidae species in northwestern Spain. *Ixodes ricinus* was the most frequent ixodid tick whereas other tick species such as *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *I. frontalis* and *I. acuminatus* were only occasionally found.

2nd. *Ixodes ricinus* exhibited a unimodal activity pattern in the northwest of Spain, showing the highest density from late spring to early summer, especially in May, regardless of the stage of development and the studied area. Population dynamics could not be analysed in the other tick species due to the low number of specimens collected.

3rd. The phenology of *I. ricinus* was directly associated with accumulated temperature, photoperiod and maximum average temperature; in contrast, it was inversely associated with the maximum average relative humidity. These variables allow for the prediction of those periods of higher tick populations where the risk of exposure and transmission of pathogens is increased.

4th. Five genera of pathogens were detected in *I. ricinus*, being *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. the most prevalent; *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. and *Theileria* spp. were occasionally found; coinfections were not common being predominant those integrated by the former two pathogens. *Ixodes frontalis* were positive to *Rickettsia* spp. and *Anaplasma* spp. *Rickettsia* spp. was the only pathogen detected in *D. marginatus* and *D. reticulatus*; in contrast, no pathogens were detected in *I. acuminatus*.

5th. Low percentages of *I. ricinus* and *I. frontalis* were positive to *Anaplasma phagocytophilum*, but no potential pathogenic strains were mainly found after sequence analysis of both *groESL* and 16S *rRNA* genes.

6th. A low prevalence of zoonotic *Babesia venatorum* and *Babesia microti* was detected in *I. ricinus*. In addition, *Theileria* sp. OT3 was also identified; since its main vector and pathogenicity remain unknown, further investigations are needed to unravel the role of *I. ricinus* in the transmission of this piroplasm.

7th. Six *Borrelia* species/genospecies with zoonotic potential were detected: five belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato group, related with Lyme disease (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. lusitaniae*), and one species belonging to the tick-borne relapsing fever group (*B. miyamotoi*).

8th. *Rickettsia* species were identified in all *D. marginatus* and in a high percentage of *D. reticulatus* (*R. slovacica* and *Candidatus R. rioja/R. raoultii*). In addition, a high percentage of *I. ricinus* were also positive and five potentially zoonotic species were found: *R. raoultii*, *R. slovacica*, *Candidatus R. rioja*, *R. felis* and *R. monacensis*. Since *I. ricinus* is an unusual vector of the first four species, further studies are needed to unravel the role of this tick species in the maintenance and transmission of these *Rickettsia* species.

9th. *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Rickettsia* spp. prevalence was significantly higher in *I. ricinus* from mountain and coastal areas, respectively.

10th. The prevalence of *B. burgdorferi* s.l. and *Rickettsia* spp. in free-living *I. ricinus* was not related to the density of questing ticks; however, the acarological risk for acquiring some pathogens increases with the number of free-living ticks.

11th. Most of the microorganism species and strains found in ticks from northwestern Spain, except for *B. burgdorferi* s.l., are not a cause of disease in animals or their pathogenicity for animals remains unknown.

12th. Our data suggest a noticeable risk of acquiring some tick-borne diseases in north-western Spain, especially Borreliosis and Rickettsiosis. Therefore, people should be aware of the potential risk of tick bites.



5. CONCLUSIÓN

Dos resultados obtidos neste traballo, extraíense as seguintes conclusións:

1ª. O estudo morfolóxico e molecular permitiu identificar 5 especies de ixódidos na vexetación do noroeste de España, sendo *Ixodes ricinus* a máis abundante, mentres que *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes frontalis* e *Ixodes acuminatus* só se atoparon de xeito ocasional.

2ª. *Ixodes ricinus* presentou un patrón de actividade unimodal, recolléndose o maior número de exemplares a finais de primavera e principios de verán, especialmente en maio, independentemente do estadio e da zona de recollida das mostras. A dinámica poboacional non se puido establecer para o resto de especies ao carecer dun número suficiente de exemplares.

3ª. A fenoloxía de *I. ricinus* estivo directamente asociada coa temperatura acumulada, o fotoperíodo e a temperatura máxima media, e inversamente relacionada co aumento da humidade relativa máxima media. Estas variables permiten predicir en que épocas do ano haberá maior número de carrachas na vexetación e por tanto maior risco de exposición e transmisión dos patóxenos que vehiculan.

4ª. En *I. ricinus* detectáronse os 5 xéneros de patóxenos estudados, sendo os máis prevalentes *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. e en menor proporción *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Theileria* spp.; as coinfeccións non foron habituais e predominaron as producidas polos dous primeiros patóxenos. En *I. frontalis* acháronse *Rickettsia* spp. e *Anaplasma* spp. En *D. marginatus* e *D. reticulatus* unicamente se detectou *Rickettsia* spp., mentres que en *I. acuminatus* non se identificou ningún patóxeno.

5^a. Unha pequena porcentaxe de *I. ricinus* e *I. frontalis* estaban infectados con *Anaplasma phagocytophilum*, aínda que mediante o estudo conxunto dos xenos *groESL* e *16S ARNr* comprobouse que a maioría das variantes atopadas non son potencialmente zoonóticas.

6^a. En *I. ricinus* detectáronse baixas prevalencias de *Babesia venatorum* e *Babesia microti*, que potencialmente son patóxenas para as persoas. Así mesmo, atopouse *Theileria* sp. OT3 e, debido a que se descoñece cal é o seu vector e patoxenicidade, sería de gran interese realizar estudos máis amplos para determinar o papel desta carracha na transmisión deste patógeno.

7^a. Identificáronse 6 especies/xenoespecies de *Borrelia* potencialmente zoonóticas: 5 do grupo *B. burgdorferi* sensu lato, relacionadas coa Enfermidade de Lyme (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto e *B. lusitaniae*), e unha do grupo das febres recorrentes (*B. miyamotoi*).

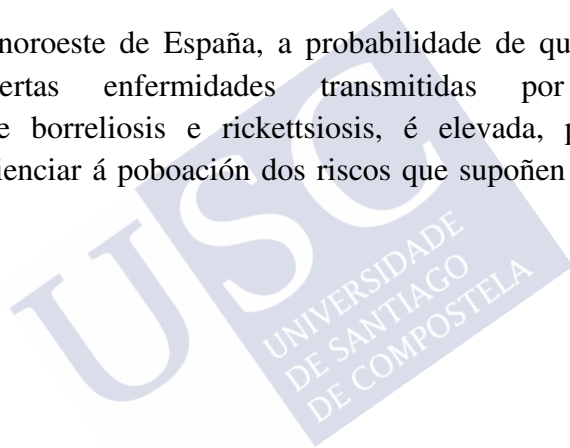
8^a. En todos os *D. marginatus* e nunha elevada porcentaxe de *D. reticulatus* identificáronse especies de *Rickettsia* (*R. slovaca* e *Candidatus R. rioja/ R. raoultii*). Ademais, unha elevada proporción de *I. ricinus* tamén resultaron positivos identificándose 5 especies potencialmente zoonóticas: *R. raoultii*, *R. slovaca*, *Candidatus R. rioja*, *R. felis* e *R. monacensis*. Con todo, debido a que as 4 primeiras especies están asociadas a outros vectores, necesítanse estudos máis amplos para determinar a intervención de *I. ricinus* no mantemento e transmisión destas especies de *Rickettsia*.

9^a. A zona influíu significativamente sobre as prevalencias de *B. burgdorferi* s.l. e *Rickettsia* spp., sendo éstas significativamente superiores en *I. ricinus* procedentes da montaña e da costa, respectivamente.

10^a. Constatouse que a prevalencia de *B. burgdorferi* s. l. e *Rickettsia* spp. non está relacionada coa densidade de *I. ricinus* na vexetación; con todo, se hai un maior número de carrachas en determinadas épocas do ano aumenta o risco de picadura e, por tanto, de transmisión de patóxenos.

11^a. A maioría das especies e variantes dos microorganismos identificados nas carrachas da zona de estudo, a excepción de *B. burgdorferi* s.l., non están directamente implicados ou se descoñece a súa importancia na saúde dos animais.

12^a. No noroeste de España, a probabilidade de que as persoas adquiran certas enfermidades transmitidas por carrachas, especialmente borreliosis e rickettsiosis, é elevada, polo que se debería concienciar á poboación dos riscos que supoñen as picaduras de carrachas.







RESUMEN



6. RESUMEN

Con objeto de conocer las principales especies de garrapatas exófilas y su estacionalidad en el noroeste de España, así como los diferentes agentes patógenos que éstas vehiculan y su dinámica de infección, durante 2 años consecutivos (noviembre del 2015 a octubre del 2017) se realizó, mediante el método del bandereo, una recogida mensual de garrapatas en tres zonas de muestreo (costa, meseta y montaña).

Se recogieron 6.956 garrapatas, cuya identificación específica se realizó siguiendo diversas claves morfológicas. Posteriormente, de cada especie de garrapata se seleccionaron 2 ejemplares, considerando el sexo y estadio, para obtener imágenes bajo la lupa y por microscopía electrónica de barrido. Además, varios ejemplares de cada especie y estadio se seleccionaron para confirmar la identificación morfológica mediante el análisis de la secuencia de un fragmento del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosómico. Así, se identificaron 5 especies de ixódidos, siendo *Ixodes ricinus* (99,25%) la especie más abundante, mientras que *Dermacentor marginatus* (0,27%), *Dermacentor reticulatus* (0,24%), *Ixodes frontalis* (0,22%) e *Ixodes acuminatus* (0,01%) se hallaron de forma ocasional. Además, *I. ricinus* fue la única especie de garrapata encontrada en todos los estadios de desarrollo (652 larvas, 5.767 ninfas, 227 machos y 258 hembras); sólo se encontraron 1 larva y 14 ninfas de *I. frontalis*, 36 adultos de *Dermacentor* (15 hembras y 4 machos de *D. marginatus* y 10 hembras y 7 machos de *D. reticulatus*) y un macho adulto de *I. acuminatus*.

El estudio de dinámica de las poblaciones de garrapatas solamente se realizó en *I. ricinus* debido al escaso número de ejemplares recogidos de las otras especies. De este modo se observó que el número de ninfas y adultos de *I. ricinus* se incrementó a finales de primavera y principios de verano, observándose un máximo en el

mes de mayo, donde se capturaron entre el 20% y el 39% de todas las garrapatas, independientemente del estadio y la zona de muestreo.

Para analizar la posible influencia de diferentes variables climáticas (temperaturas media, máxima, mínima, temperatura acumulada y temperatura del aire a 10 cm del suelo, porcentajes de humedad relativa, máxima y media, punto de rocío, días de helada, índice de vegetación de diferencia normalizada y fotoperiodo) sobre la fracción normalizada acumulada de ninfas y adultos de *I. ricinus* se aplicó un modelo lineal generalizado mixto. Así, se constató que el fotoperiodo, la temperatura máxima media y, especialmente, la temperatura acumulada, se relacionaron positivamente con la fenología de las poblaciones de *I. ricinus*, mientras que el aumento de la humedad relativa máxima media se asoció con una disminución del número de esta especie en la vegetación. Estas variables permiten predecir en qué épocas del año habrá mayor número de garrapatas en la vegetación y por tanto un mayor riesgo de exposición y transmisión de los patógenos que vehiculan.

Posteriormente, se detectó y determinó la prevalencia de distintos patógenos en los vectores. El número mínimo de garrapatas a analizar para hallar una diferencia de prevalencias del 10% entre las zonas de muestreo y estadios (adultos y ninfas), con un intervalo de confianza del 95% y una precisión del 5%, fue de 286 garrapatas. Cuando en uno de los muestreos mensuales el número de ejemplares de una determinada especie era muy reducido se procesaron todas las garrapatas recogidas; finalmente se analizaron un total de 1.056 ejemplares de *I. ricinus* y todas las garrapatas recogidas pertenecientes a otras especies.

Tras la extracción de ADN mediante un kit comercial, la presencia de *Anaplasma* spp. en las garrapatas se detectó con una qPCR comercial y, posteriormente, las muestras positivas se procesaron con tres PCR convencionales que amplifican fragmentos de los genes que codifican para las proteínas *groESL*, *msp2* y para el 16S *ARNr*. También se empleó una qPCR para detectar ADN de *Babesia* spp. y *Theileria* spp.; las muestras positivas se caracterizaron

mediante dos PCR convencionales que amplifican parcialmente el gen 18S *ARNr* y el espaciador intergénico transcrito ITS1. Por su parte, las garrapatas positivas a *Borrelia* spp. se detectaron mediante una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen de la flagelina (*fla*) y se confirmaron tras el análisis de la secuencia parcial de la región espaciadora intergénica (IGS) *rrfA-rrlB* y del gen que codifica para la proteína *GlpQ*. Finalmente, la presencia de *Rickettsia* spp. se detectó mediante PCR de los genes *rOmpA* y *rOmpB*, y los positivos se analizaron además para el gen que codifica para el enzima *gltA*.

En *I. ricinus*, se detectaron todos los patógenos anteriormente citados, siendo los más frecuentes *Rickettsia* spp. (20,74%) y *Borrelia* spp. (12,31%), mientras que la prevalencia de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. y *Theileria* spp. fue inferior al 2%. En *I. frontalis* se hallaron *Rickettsia* spp. y *Anaplasma* spp., ambas con el mismo porcentaje de infección (8,33%). En *Dermacentor* spp. únicamente se observó *Rickettsia* spp.; en *D. marginatus* con una prevalencia del 100% y en *D. reticulatus* del 23,53%. En el ejemplar de *I. acuminatus* no se detectó ningún patógeno.

Anaplasma spp. se identificó en *I. ricinus* (0,66%) y en *I. frontalis* (8,33%). Tras el análisis de la secuencia de las muestras positivas, todas se identificaron como *A. phagocytophilum*, aunque el estudio conjunto de los genes *groESL* y 16S *ARNr* permitió determinar que la mayoría de las secuencias no coincidían con las variantes patógenas para las personas y animales. Además, en un pequeño porcentaje de *I. ricinus* se hallaron varias especies de *Babesia* (1,80%) y *Theileria* (0,19%), incluyendo *B. venatorum* (1,52%), *B. microti* (0,28%) y *Theileria* sp. OT3 (0,19%). Estos resultados presentan un elevado interés epidemiológico ya que las dos especies de *Babesia* detectadas pueden causar babesiosis en personas. Además, resulta muy interesante la detección de *T. sp. OT3* en *I. ricinus* ya que se desconoce cuál es su vector y su patogenicidad por lo que sería de gran interés realizar estudios más amplios para determinar el papel de esta garrapata en la transmisión de este patógeno.

No fue posible realizar un estudio completo de la dinámica de infección de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. y *Theileria* spp., debido a que el número de garrapatas positivas fue muy reducido. Por el contrario, se analizó la posible influencia de la zona, año y estación del muestreo, así como del estadio de desarrollo de las garrapatas sobre la prevalencia de *Borrelia* spp. y *Rickettsia* spp en *I. ricinus*. Además, se realizó una correlación de Spearman para constatar si existía alguna relación entre el número de total de garrapatas recogidas y la prevalencia de estos dos patógenos.

Se detectó ADN de *Borrelia* spp. en el 12,31% de los *I. ricinus*. El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar 6 especies/genoespecies patógenas de *Borrelia*, 5 de ellas pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) y *B. lusitaniae*) y 1 del grupo de borrelias causantes de fiebre recurrente (*B. miyamotoi*). Todas las genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. se hallaron en todos los estadios de *I. ricinus*, aunque hubo grandes diferencias respecto a su prevalencia; *B. burgdorferi* s.l. fue más prevalente en las hembras (19,80%) que en machos (9,90%) y ninfas (9,97%), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 18,766$; $p < 0,001$). La prevalencia de *B. miyamotoi*, también fue superior en las hembras (1,98%) que en machos (0,99%) y en ninfas (0,46%), aunque este caso las diferencias carecieron de significación estadística ($p > 0,05$).

Al considerar las tres áreas de muestreo, se observó que la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. era significativamente más elevada (18,55%) en la montaña que en la costa (8,25%; $\chi^2 = 17,269$; $p < 0,001$) y que en la meseta (8,09%; $\chi^2 = 13,319$; $p < 0,001$). Además, en la zona de montaña, se detectaron prevalencias significativamente más elevadas para *B. afzelii* ($\chi^2 = 16,498$; $p < 0,001$). *Borrelia lusitaniae* solamente se identificó en la montaña, que fue la única zona en la que se hallaron todas las genoespecies de *Borrelia*. Al tener en cuenta el año de estudio, se observó que las prevalencias de *B. burgdorferi* s.l. y *B. miyamotoi* fueron superiores durante el primer año, pero estas diferencias no fueron significativas. Al considerar la estación del año,

se observó que la prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. fue superior en verano (15,44%) mientras que la prevalencia de *B. miyamotoi* lo fue en invierno (1,42%), aunque estas diferencias carecieron de significación. Además, se comprobó la ausencia de un patrón estacional respecto a la distribución de las genopecies/especies de *Borrelia* a lo largo de los meses de muestreo. Finalmente se constató que no existía una asociación entre la prevalencia de *Borrelia* spp. y el número total de *I. ricinus* recogidas por zona y estación.

Se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* (20,74%), *I. frontalis* (8,33%), *D. marginatus* (100%) y *D. reticulatus* (23,53%), identificándose 5 especies potencialmente zoonóticas: *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. monacensis*, *R. slovacica* y *R. felis*. En *I. ricinus* se detectaron todas las especies identificadas; no obstante, se desconoce el papel de esta especie de garrapata en la transmisión y mantenimiento de *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. slovacica* y *R. felis*. Se identificó *R. slovacica* y *Candidatus R. rioja/R. raoultii* en ambas especies de *Dermacentor* y en *I. frontalis*. Respecto a la influencia del estadio, se observó que la prevalencia era ligeramente superior en los machos de *I. ricinus* (24,26%) que en las hembras (20,30%) y ninfas (19,79%), aunque estas diferencias no fueron significativas.

La prevalencia de *Rickettsia* spp. fue significativamente más elevada en los *I. ricinus* capturados en la costa (26,21%) que en los de la meseta (15,81%; $\chi^2 = 9,7146$; $p = 0,002$) y la montaña (18,28%; $\chi^2 = 6,6201$; $p = 0,010$). Así mismo, el porcentaje de infección fue significativamente más elevado ($\chi^2 = 22,498$; $p < 0,001$) en el segundo año de muestreo (26,82%) que en el primero (14,79%). En relación con la estación del año en la que se recogieron los *I. ricinus*, se constató que la prevalencia de *Rickettsia* spp. era significativamente menor ($\chi^2 = 44,805$; $p < 0,001$) en verano (8,88%) que en invierno (32,55%), en otoño (27,70%) y en primavera (19,68%). Así mismo, las diferencias encontradas entre la primavera y el invierno también fueron significativas ($\chi^2 = 12,303$; $p < 0,001$). Igual que para *Borrelia* spp., no se observó ni un patrón estacional en la distribución de las

especies de *Rickettsia* spp. durante los meses de muestreo ni una asociación entre la prevalencia de esta bacteria y el número total de *I. ricinus* recogidos por zona y estación, sin embargo, en ambos casos, cuando en determinadas épocas del año hay un mayor número de garrapatas aumenta el riesgo de picadura y, por tanto, de transmisión de patógenos.

El estudio conjunto de todos los patógenos permitió determinar que la coinfección más frecuente en garrapatas era *Borrelia burgdorferi* s.l. y *Rickettsia* spp. Solamente una garrapata estaba infectada por más de dos patógenos distintos, *B. garinii* del grupo *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi* del grupo de las fiebres recurrentes y *Candidatus R. rioja*.

En el noroeste de España, la mayoría de las especies y variantes de los microorganismos identificados en las garrapatas exófilas de la zona de estudio, a excepción de *B. burgdorferi* s.l., no están directamente implicados o se desconoce su importancia en la salud de los animales. Sin embargo, la probabilidad de que las personas adquieran ciertas enfermedades transmitidas por garrapatas, especialmente borreliosis y rickettsiosis, es elevada, por lo que se debería concienciar a la población de los riesgos que entrañan las picaduras de garrapatas.

Palabras clave: Garrapatas exófilas, *Ixodes ricinus*, dinámica de poblaciones, Piroplasmas, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*.

SUMMARY

During two consecutive years (November 2015 - October 2017), ticks were monthly collected by flagging in three sampling areas from north-western Spain (coast, plateau and mountain) in order to identify the main exophilic tick species and assess their seasonality. Tick-borne pathogens and its infection dynamics were also studied.

A total of 6,956 ticks were collected and identified using morphological keys. Two specimens of each tick species and stage of development were selected to obtain images under stereo microscope and by scanning electron microscopy. In addition, several specimens of each species and stage of development were selected and analysed at the 16S *rRNA* gene to confirm the morphological identification. Thus, 5 species of Ixodid ticks were identified; *Ixodes ricinus* (99.25%) was the most abundant species, whereas *Dermacentor marginatus* (0.27%), *Dermacentor reticulatus* (0.24%), *Ixodes frontalis* (0.22%) and *Ixodes acuminatus* (0.01%) were only occasionally found. In addition, *I. ricinus* was the only tick species where all stages of development were collected (652 larvae, 5,767 nymphs, 227 males and 258 females). Only 1 larva and 14 nymphs of *I. frontalis*, 36 adults of *Dermacentor* (15 females and 4 males of *D. marginatus* and 10 females and 7 males of *D. reticulatus*) and one *I. acuminatus* male were found.

Population dynamics was only studied in *I. ricinus* since the number of specimens of other tick species did not allow performing reliable statistical analysis. It was shown that the number of nymphs and adults of *I. ricinus* increased during late spring and early summer, showing a peak in May; the number of ticks collected in that month represented the 20-39% of the total nymphs and adults for each site and year of sampling.

A mixed generalized linear model was applied in order to analyse the possible influence of some ecological variables (average, maximum and minimum temperature, accumulated temperature, air

temperature at 10 cm above ground level, relative, maximum and minimum humidity, dew point, number of days of frost, normalized difference vegetation index and photoperiod) on the accumulated normalized fraction of nymphs and adults of *I. ricinus*. Thus, it was found that the photoperiod, the maximum average temperature and, especially, the accumulated temperature, were positively related to the phenology of *I. ricinus* populations. In contrast, the maximum average relative humidity was negatively associated with the number of this tick species found in vegetation. These variables allow predicting those periods of higher tick populations where the risk of exposure and transmission of pathogens is increased.

The minimum number of ticks to be processed was calculated with a 95% confidence interval and a 5% type II error to detect differences of 10% in the prevalence of the different tick-borne pathogens in ticks between sampling areas and stages of development (adults and nymphs). When a small number of a particular tick species was found in a single monthly sampling, all collected specimens were processed. A total number of 1,056 *I. ricinus* and all collected ticks belonging to other species were analysed.

DNA was extracted using a commercial kit. The presence of *Anaplasma* DNA in the ticks was detected using a commercial qPCR kit and positive samples were further analysed by conventional PCR targeting the *groESL*, 16S *rRNA* and *msp2* genes. *Babesia* and *Theileria* DNA was firstly detected using a commercial qPCR kit and positive samples were molecularly characterized at both the 18S *rRNA* gene and the internal transcribed spacer 1 (ITS1). *Borrelia* positive ticks were detected by a nested PCR targeting the flagellin gene (*fla*), and positive samples were subjected to a PCR assay to amplify a fragment of both the *rrfA-rrlB* intergenic spacer region (IGS) and the *GlpQ* gene. Finally, two PCR assays targeting the *rOmpA* and *rOmpB* encoding genes of *Rickettsia* spp. were carried out; positive samples were further analysed at the *gltA* gene.

All the studied pathogens were detected in *I. ricinus*, being *Rickettsia* spp. (20.74%) and *Borrelia* spp. (12.31%) the most

prevalent; in contrast, the prevalence of *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. and *Theileria* spp. never exceeded 2%. Co-infections were not common, being predominant those integrated by the former two bacteria. Only *Rickettsia* spp. and *Anaplasma* spp. were found in *I. frontalis*, showing the same percentage of infection (8.33%). *Rickettsia* spp. was the only pathogen detected in *D. marginatus* and *D. reticulatus*. Finally, no pathogens were detected in *I. acuminatus*.

Anaplasma spp. was identified in *I. ricinus* (0.66%) and *I. frontalis* (8.33%). All positive samples were identified as *A. phagocytophilum*, but no potential pathogenic strains for people or animals were mainly found after sequence analysis of both *groEL* and 16S *rRNA* genes. In addition, several species of *Babesia* (1.80%) and *Theileria* (0.19%), including *B. venatorum* (1.52%), *B. microti* (0.28%) and *Theileria* sp. OT3 (0.19%) were detected in a small percentage of *I. ricinus*. These results have epidemiological interest since the identified species of *Babesia* could be zoonotic. In addition, the detection of *T.* sp. OT3 in *I. ricinus* is noteworthy since its main vector and pathogenicity remain unknown; thus, further investigations are needed to unravel the role of *I. ricinus* in the transmission of this piroplasm.

The study of the infection dynamics of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. and *Theileria* spp. was not performed due to the small number of positive ticks. In contrast, the possible influence of several factors such as the sampling area, year and season of sampling and tick development stage, on the prevalence of both *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* was analysed. In addition, a Spearman correlation test was carried out to assess the probable relationship between the total number of ticks collected and the prevalence of these two pathogens.

Borrelia DNA was detected in 12.31% of *I. ricinus*. Sequence analysis allowed the identification of six pathogenic species/genospecies of *Borrelia*, five belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato group and thus related to Lyme disease (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi sensu stricto* and *B. lusitaniae*),

and one belonging to the tick-borne relapsing fever group (*B. miyamotoi*). All *B. burgdorferi* s.l. genospecies were found in all *I. ricinus* development stages; nevertheless, *B. burgdorferi* s.l. prevalence was significantly ($\chi^2 = 18.766$; $p < 0.001$) higher in females (19.80%) than in males (9.90%) and nymphs (9.97%). The prevalence of *B. miyamotoi* was also higher in females (1.98%) than in males (0.99%) and nymphs (0.46%), but these differences were not significant ($p > 0.05$).

It was also found that the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. was significantly higher (18.55%) in the mountain than in the coast (8.25%, $\chi^2 = 17.269$; $p < 0.001$) and the plateau (8.09%; $\chi^2 = 13.319$; $p < 0.001$). In addition, the prevalence of *B. afzelii* was significantly higher in the mountain area ($\chi^2 = 16.498$; $p < 0.001$). *Borrelia lusitaniae* was only identified in the mountain, the only area where all *Borrelia* genospecies were found. When the year of study was considered, it was observed that the prevalences of *B. burgdorferi* s.l. and *B. miyamotoi* were highest in the first year, but these differences were not significant. When considering the season, the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. was highest in the summer (15.44%) whereas the prevalence of *B. miyamotoi* was highest in the winter (1.42%), but these differences were not significant in any case. In addition, no seasonal (monthly) pattern in the distribution of the *Borrelia* species/genospecies was found. Finally, no association between the prevalence of *Borrelia* spp. and the total number of *I. ricinus* collected by sampling area and season was found.

Rickettsia DNA was detected in *I. ricinus* (20.74%), *I. frontalis* (8.33%), *D. marginatus* (100%) and *D. reticulatus* (23.53%). Five potentially zoonotic species were identified: *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. monacensis*, *R. slovaca* and *R. felis*. All species were found in *I. ricinus*, however the role of this tick species in the maintenance and transmission of *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. slovaca* and *R. felis* has not been unravelled yet. Both *Dermacentor* species were positive to *R. slovaca* and *Candidatus R. rioja*/*R. raoultii*; finally, only *Candidatus R. rioja* was detected in *I. frontalis*. In addition, the

prevalence of *Rickettsia* spp. was higher in *I. ricinus* males (24.26%) than in females (20.30%) and nymphs (19.79%), but no significant differences were found.

Rickettsia spp. prevalence was significantly higher in *I. ricinus* from the coast (26.21%) than in those from the plateau (15.81%; $\chi^2 = 9.7146$; $p = 0.002$) and the mountain (18.28%; $\chi^2 = 6.6201$; $p = 0.010$). Similarly, the percentage of infection was significantly higher ($\chi^2 = 22.498$; $p < 0.001$) in the second year of sampling (26.82%) than in the first one (14.79%). The prevalence of *Rickettsia* spp. was significantly lower ($\chi^2 = 44.805$; $p < 0.001$) in summer (8.88%) than in winter (32.55%), autumn (27.70%) and spring (19.68%); moreover, differences between spring and winter were also significant ($\chi^2 = 12.303$; $p < 0.001$).

As observed for *Borrelia* spp., no seasonal pattern was observed in the distribution of the different species of *Rickettsia*; in addition, no association between the prevalence of this bacterium and the total number of *I. ricinus* collected in each sampling area and season was found. However, the acarological risk for acquiring *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. may increase with the number of free-living ticks due to a higher risk of tick bite.

The most frequent co-infection in ticks was integrated by *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Rickettsia* spp. Only a single tick was infected by three different pathogens, *B. garinii* (*B. burgdorferi* s.l. group), *B. miyamotoi* (relapsing fever group) and *Candidatus R. rioja*.

Most of the microorganism species and strains found in questing ticks from north-western Spain, except for *B. burgdorferi* s.l., are not a cause of disease in animals or their pathogenicity for animals remains unknown. In contrast, there is a noticeable risk for people to acquire some tick-borne diseases in the study area, especially Borreliosis and Rickettsiosis. Therefore, people should be aware of the potential risk of tick bites.

Keywords: Exophilic ticks, *Ixodes ricinus*, population dynamics, Piroplasms, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*.

RESUMO

Con obxecto de coñecer as principais especies de carrachas exófilas e a súa estacionalidade no noroeste de España, así como os diferentes axentes patóxicos que éstas vehiculan e a súa dinámica de infección, durante 2 anos consecutivos (novembro do 2015 a outubro do 2017) realizouse, mediante o método da bandeira, unha recollida mensual de carrachas en tres zonas de mostraxe (costa, meseta e montaña).

Recolléronse 6.956 carrachas, cuxa identificación específica realizouse seguindo diversas claves morfolóxicas. Posteriormente, seleccionáronse 2 exemplares de cada especie de carracha, considerando o sexo e estadio, para obter imaxes baixo a lupa e por microscopía electrónica de varrido. Ademais, seleccionáronse varios exemplares de cada especie e estadio para confirmar a identificación morfolóxica mediante a análise da secuencia dun fragmento do xene que codifica para a subunidade 16S do ARN ribosómico. Así, identificáronse 5 especies de ixódidos, sendo *Ixodes ricinus* (99,25%) a especie máis abundante, mentres que *Dermacentor marginatus* (0,27%), *Dermacentor reticulatus* (0,24%), *Ixodes frontalis* (0,22%) e *Ixodes acuminatus* (0,01%) atopáronse de xeito ocasional. Ademais, *I. ricinus* foi a única especie de carracha onde se atoparon todos os estadios de desenvolvemento (652 larvas, 5.767 ninfas, 227 machos e 258 femias); só se atoparon 1 larva e 14 ninfas de *I. frontalis*, 36 adultos de *Dermacentor* (15 femias e 4 machos de *D. marginatus* e 10 femias e 7 machos de *D. reticulatus*) e un macho adulto de *I. acuminatus*.

O estudo da dinámica das poboacións de carrachas soamente se realizou en *I. ricinus* debido ao escaso número de exemplares recollidos das outras especies. Deste xeito observouse que o número de ninfas e adultos de *I. ricinus* incrementouse durante finais de primavera e principios de verán, observándose un máximo no mes de

maio, onde se capturaron entre o 20% e o 39% de todas as carrachas, independentemente do estadio e a zona de mostraxe.

Para analizar a posible influencia das diferentes variables climáticas (temperaturas media, máxima, mínima, temperatura acumulada e temperatura do aire a 10 cm do chan, porcentaxes de humidade relativa, máxima e media, temperatura de orballo, días de xeadas, índice de vexetación de diferenza normalizada e fotoperíodo) sobre a fracción normalizada acumulada de ninfas e adultos de *I. ricinus* aplicouse un modelo lineal xeneralizado mixto. Así, constatouse que o fotoperíodo, a temperatura máxima media e, especialmente, a temperatura acumulada, relacionábanse positivamente coa fenoloxía das poboacións de *I. ricinus*, mentres que o aumento da humidade máxima relativa media asociouse cunha diminución do número desta especie na vexetación. Estas variables permiten predicir en que épocas do ano haberá maior número de carrachas na vexetación e por tanto un maior risco de exposición e transmisión dos patóxenos que vehiculan.

Posteriormente, detectáronse distintos patóxenos nos vectores e se determinou a súa prevalencia. O número mínimo de carrachas a analizar para achar unha diferenza de prevalencias do 10% entre as zonas de mostraxe e estadios (adultos e ninfas), cun intervalo de confianza do 95% e unha precisión do 5%, foi de 286 carrachas. Cando nunha das mostraxes mensuais o número de exemplares dunha determinada especie era moi reducido, procesáronse todas as carrachas recollidas; finalmente analizáronse un total de 1.056 exemplares de *I. ricinus* e todas as carrachas recollidas pertencentes a outras especies.

Trala extracción de ADN mediante un kit comercial, a presenza de *Anaplasma* spp. nas carrachas detectouse cunha qPCR comercial e, posteriormente, as mostras positivas procesáronse con 3 PCR convencionais que amplifican fragmentos dos xenos que codifican para as proteínas *groESL*, *msp2* e para o 16S ARNr. Tamén se empregou unha qPCR para detectar ADN de *Babesia* spp. e *Theileria* spp.; as mostras positivas caracterizáronse mediante dúas PCR

convencionais que amplifican parcialmente o xene 18S ARNr e o espaciador interxénico transcrito ITS1. Por outra banda, as carrachas positivas a *Borrelia* spp. detectáronse mediante unha PCR aniñada que amplifica un fragmento do xene da flaxelina (*fla*) e confirmáronse tras a análise da secuencia parcial da rexión espaciadora interxénica (IGS) *rrfA-rrlB* e do xene que codifica para a proteína *GlpQ*. Finalmente, a presenza de *Rickettsia* spp. detectouse mediante PCR dos xenes *rOmpA* e *rOmpB*, e os positivos analizáronse ademais para o xene que codifica para o encima *gltA*.

En *I. ricinus* detectáronse todos os patóxenos anteriormente citados, sendo os máis frecuentes *Rickettsia* spp. (20,74%) e *Borrelia* spp. (12,31%), mentres que a prevalencia de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* spp. foi inferior ao 2%. En *I. frontalis* atopáronse *Rickettsia* spp. e *Anaplasma* spp., ambas ca mesma porcentaxe de infección (8,33%). En *Dermacentor* spp. unicamente observouse *Rickettsia* spp., cunha prevalencia do 100% en *D. marginatus* e do 23,53% en *D. reticulatus*. No exemplar de *I. acuminatus* non se detectou ningún patóxeno.

Anaplasma spp. identificouse en *I. ricinus* (0,66%) e en *I. frontalis* (8,33%). Trala análise da secuencia das mostras positivas, todas se identificaron como *A. phagocytophilum*, aínda que o estudo conxunto dos xenes *groEL* e 16S ARNr permitiu determinar que a maioría das secuencias non coincidía totalmente coas variantes patóxenas para as persoas e animais. Ademais, nunha pequena porcentaxe de *I. ricinus* atopáronse varias especies de *Babesia* (1,80%) e *Theileria* (0,19%), incluíndo *B. venatorum* (1,52%), *B. microti* (0,28%) e *Theileria* sp. OT3 (0,19%). Estes resultados presentan un elevado interese epidemiolóxico xa que as dúas especies de *Babesia* detectadas poden causar babesiose en persoas. Ademais, resulta moi interesante a detección de *T. sp. OT3* en *I. ricinus* xa que se descoñece cal é o seu vector e a súa patoxenicidade, polo que sería de gran interese realizar estudos máis amplos para determinar o papel desta carracha na transmisión deste patóxeno.

Non foi posible realizar un estudo completo da dinámica de infección de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* spp., debido a que o número de carrachas positivas foi moi reducido. Pola contra, analizouse a posible influencia da zona, ano e estación da mostraxe, así como do estadio de desenvolvemento das carrachas sobre a prevalencia de *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp en *I. ricinus*. Ademais, realizouse unha correlación de Spearman para constatar si existía algunha relación entre o número de total de carrachas recollidas e a prevalencia destes dous patóxenos.

Detectouse ADN de *Borrelia* spp. no 12,31% dos *I. ricinus*. A análise das secuencias obtidas permitiu identificar 6 especies/xenoespecies patóxenas de *Borrelia*, 5 delas pertencentes ao grupo *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) e *B. lusitaniae*) e 1 do grupo de borrelias causantes da febre recorrente (*B. miyamotoi*). Todas as xenoespecies de *B. burgdorferi* s.l. atopáronse en todos os estadios de *I. ricinus*, aínda que houbo grandes diferenzas respecto a súa prevalencia; *B. burgdorferi* s.l. foi máis prevalente nas femias (19,80%) que nos machos (9,90%) e ninfas (9,97%), sendo estas diferenzas significativas ($\chi^2 = 18,766$; $p < 0,001$). A prevalencia de *B. miyamotoi*, tamén foi superior nas femias (1,98%) que nos machos (0,99%) e nas ninfas (0,46%), aínda que neste caso as diferenzas careceron de significación estatística ($p > 0,05$).

Ao considerar as tres áreas de mostraxe, observouse que a prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. era significativamente máis elevada (18,55%) na montaña que na costa (8,25%; $\chi^2 = 17,269$; $p < 0,001$) e na meseta (8,09%; $\chi^2 = 13,319$; $p < 0,001$). Ademais, na zona de montaña, detectáronse prevalencias significativamente máis elevadas para *B. afzelii* ($\chi^2 = 16,498$; $p < 0,001$). *Borrelia lusitaniae* soamente se identificou na montaña, que foi a única zona na que se atoparon todas as xenoespecies de *Borrelia*. Ao ter en conta o ano de estudo, observouse que as prevalencias de *B. burgdorferi* s.l. e *B. miyamotoi* foron superiores durante o primeiro ano, pero estas diferenzas non foron significativas. Ao considerar a estación do ano, observouse que

a prevalencia de *B. burgdorferi* s.l. foi superior no verán (15,44%) mentres que a prevalencia de *B. miyamotoi* foi no inverno (1,42%), aínda que estas diferenzas careceron de significación. Ademais, comprobouse a ausencia dun patrón estacional respecto a distribución das especies/xenoespecies de *Borrelia* ao longo dos meses de mostraxe. Finalmente constatouse que non existía unha asociación entre a prevalencia de *Borrelia* spp. e o número total de *I. ricinus* recollidas por zona e estación.

Detectouse ADN de *Rickettsia* spp. en *I. ricinus* (20,74%), *I. frontalis* (8,33%), *D. marginatus* (100%) e *D. reticulatus* (23,53%), identificándose 5 especies potencialmente zoonóticas: *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. monacensis*, *R. slovaca* e *R. felis*. En *I. ricinus* detectáronse todas as especies identificadas; con todo, descoñécese o papel desta especie de carracha na transmisión e mantemento de *R. raoultii*, *Candidatus R. rioja*, *R. slovaca* e *R. felis*. Identificouse *R. slovaca* e *Candidatus R. rioja/R. raoultii* en ámbalas dúas especies de *Dermacentor* e *Candidatus R. rioja* en *I. frontalis*. Respecto á influencia do estadio, observouse que a prevalencia era lixeiramente superior nos machos de *I. ricinus* (24,26%) que nas femias (20,30%) e ninfas (19,79%), aínda que estas diferenzas non foron significativas.

A prevalencia de *Rickettsia* spp. foi significativamente máis elevada nos *I. ricinus* capturados na costa (26,21%) que nos da meseta (15,81%; $\chi^2 = 9,7146$; $p = 0,002$) e da montaña (18,28%; $\chi^2 = 6,6201$; $p = 0,010$). Así mesmo, a porcentaxe de infección foi significativamente máis elevada ($\chi^2 = 22,498$; $p < 0,001$) no segundo ano de mostraxe (26,82%) que no primeiro (14,79%). En relación coa estación do ano na que se recolleron os *I. ricinus*, constatouse que a prevalencia de *Rickettsia* spp. era significativamente menor ($\chi^2 = 44,805$; $p < 0,001$) no verán (8,88%) que no inverno (32,55%), outono (27,70%) e primavera (19,68%). Así mesmo, as diferenzas atopadas entre a primavera e o inverno tamén foron significativas ($\chi^2 = 12,303$; $p < 0,001$). Igual que aconteceu para *Borrelia* spp., non se observou ningún patrón estacional na distribución das especies de *Rickettsia* spp. durante os meses de mostraxe nin unha asociación entre a

prevalencia desta bacteria e o número total de *I. ricinus* recollidos por zona e estación, con todo, en ambos os casos, cando en determinadas épocas do ano hai un maior número de carrachas aumenta o risco de picadura e, por tanto, de transmisión de patóxenos.

O estudo conxunto de todos os patóxenos permitiu determinar que a co-infección máis frecuente en carrachas era *Borrelia burgdorferi* s.l. e *Rickettsia* spp. Soamente unha carracha estaba infectada por máis de dous patóxenos distintos, *B. garinii* do grupo *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi* do grupo das febres recorrentes e *Candidatus R. rioja*.

No noroeste de España, a maioría das especies e variantes dos microorganismos identificados nas carrachas exófilas da zona de estudo, a excepción de *B. burgdorferi* s.l., non están directamente implicados ou se descoñece a súa importancia na saúde dos animais. Pola contra, a probabilidade de que as persoas adquiran certas enfermidades transmitidas por carrachas, especialmente borreliose e rickettsiose, é elevada, polo que se debería concienciar á poboación dos riscos que supoñen as picaduras de carrachas.

Palabras chave: Carrachas exófilas, *Ixodes ricinus*, dinámica de poboación, piroplasmas, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*.





BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirrebengoa, K., Portillo, A., Santibáñez, S., Marin, J. J., Montejo, M., Oteo, J. A.** (2008). Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 528-529.
- Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., Rijpkema, S. G., Schouls, L. M.** (1999). Sexual transmission of *Borrelia garinii* by male *Ixodes persulcatus* ticks (Acari, Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 23(2), 165-9.
- Alonso-Carné, J., García-Martin, A., Estrada-Peña, A.** (2016). Modelling the phenological relationships of questing immature *Ixodes ricinus* (Ixodidae) using temperature and NDVI data. *Zoonoses and Public Health*, 63(1), 40-52.
- Alves, A. S., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A. S., Vilhena, M., de Sousa, R.** (2009). Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 1-3.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Tesouro, M. A.** (2006). Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 487-90.
- Amusatogui, I., Tesouro, M. A., Kakoma, I., Sainz, A.** (2008). Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 797-803.
- Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J., Straus, T.** (2012). Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *American Journal of Clinical Pathology*, 137(4), 562-565.
- Antunes, S., Rosa, C., Couto, J., Ferrolho, J., Domingos, A.** (2017). Deciphering *Babesia*-vector interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- Araya-Anchetta, A., Busch, J. D., Scoles, G. A., Wagner, D. M.** (2015). Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. *Infection Genetics and Evolution*, 29, 164-179.
- Asman, M., Nowak-Chmura, M., Solarz, K., Szilman, E., Semla, M., Zysk, B.** (2017). *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodida) ticks collected from Slowinski National Park (Northern Poland). *Journal of Vector Ecology*, 42(1), 200-202.
- Atif, F. A.** (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*, 114(11), 3941-3957.
- Aureli, S., Galuppi, R., Ostanello, F., Foley, J.E., Bonoli, C., Rejmanek, D., Rocchi, G., Orlandi, E., Tampieri, M.P.** (2015). Abundance of questing ticks and molecular evidence for pathogens in ticks in three parks of Emilia-Romagna region of Northern Italy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22, 459-466.
- Azad, A.F., Radulovic, S.** (2003). Pathogenic *Rickettsiae* as bioterrorism

agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 734-738.

Bajer, A., Alsarraf, M., Bednarska, M., Mohallal, E. M., Mierzejewska, E. J., Behnke-Borowczyk, J., Zalat, S., Gilbert, F., Welc-Fałęciak, R. (2014). *Babesia behnkei* sp. nov., a novel *Babesia* species infecting isolated populations of Wagner's gerbil, *Dipodillus dasyurus*, from the Sinai Mountains, Egypt. *Parasit Vectors*, 9, 7, 572.

Baldrige, G. D., Scoles, G. A., Burkhardt, N. Y., Schloeder, B., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. (2009). Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(3), 625-632.

Baráková, I., Derdákova, M., Carpi, G., Rosso, F., Collini, M., Tagliapietra, V., Ramponi, C., Hauffe, H. C., Rizzoli, A. (2014). Genetic and ecologic variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, northern Italy. *Emerging infectious diseases*, 20(6), 1082-5.

Baráková, I., Derdakova, M., Selyemova, D., Chvostac, M., Spitalska, E., Rosso, F., Collini, M., Rosa, R., Tagliapietra, V., Girardi, M., Ramponi, C., Hauffe, H.C., Rizzoli, A. (2018). Tick-borne pathogens and their reservoir hosts in northern Italy. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 9, 164-170.

Barandika, J. F., Berriatua, E., Barral, M., Juste, R. A., Anda, P., García-Perez, A. L. (2006). Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(2), 177-188.

Barandika, J. F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral,

M., Jado, I., Juste, R. A., Anda, P., García-Pérez, A. L. (2007). Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6166-6171.

Barandika, J. F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R. A., Anda, P., García-Pérez, A. L. (2008). Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 829-835.

Barandika, J. F., Hurtado, A., Juste, R. A., García-Pérez, A. L. (2010). Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-year period in northern Spain: first survey on the presence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10(10), 1027-1035.

Barandika, J. F. (2010). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: Estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de León.

Barandika, J. F., Olmeda, S. A., Casado-Nistal, M. A., Hurtado, A., Juste, R. A., Valcárcel, F., Anda, P., García-Pérez, A. L. (2011). Differences in questing tick species distribution between atlantic and continental climate regions in Spain. *Journal of Medical Entomology*, 48(1), 13-19.

Barbour, A. G., Maupin, G. O., Teltow, G. J., Carter, C. J., Piesman, J. (1996). Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of a Lyme disease-like illness. *Journal of Infectious Diseases*, 173(2), 403-409.

- Barlough, J. E., Madigan, J. E., Kramer, V. L., Clover, J. R., Hui, L. T., Webb, J. P. Vredevoe, L. K.** (1997). *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 2018-2021.
- Barbour, A. G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A. G., Diuk-Wasser, M. A., Fish, D. Tsao, JI.** (2009). Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), 1120-1131.
- Barral Lahidalga, M.** (1998). Estudio de la infección por “*Borrelia burgdorferi*”, grupo “*Ehrlichia phagocytophila*” y virus de la encefalitis ovina en las poblaciones de ixódidos de la Comunidad Autónoma Vasca. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S.** (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., Dondi, F.** (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection Genetics and Evolution*, 49, 195-211.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Zivicnjak, T., Cacciò, S. M.** (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International journal for parasitology*, 39(7), 843-848.
- Beck, R., Vojta, L., Curkovic, S., Mrljak, V., Margaletic, J., Habrun, B.** (2011). Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in Central Croatia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(1), 81-83.
- Bedford, G. A. H.** (1931). *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology*, 23(02), 230-232.
- Bernabeu-Wittel, M. del Toro, M. D., Nogueras, M. M., Muniain, M. A., Cardenosa, N., Márquez, F. J., Segura, F., Pachón, J.** (2006). Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*. 25(6), 375-381.
- Bhide, M. R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., Levkut, M.** (2005). Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43(2), 165-172.
- Bilgic, H.B., Bakirci, S., Kose, O., Unlu, A.H., Hacilarlioglu, S., Eren, H., Weir, W., Karagenc, T.** (2017). Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasites Vectors*, 10.
- BioEdit** Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> Último acceso: 23/12/2018.
- Bisanzio, D., Amore, G., Ragagli, C., Tomassone, L., Bertolotti, L., Mannelli, A.** (2008). Temporal variations in the usefulness of normalized difference vegetation index as a predictor for *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in a *Borrelia lusitaniae* focus in Tuscany, central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 45(3), 547-555.
- Bitam, I., Parola, P., Matsumoto, K., Rolain, J. M., Baziz, B., Boubidi, S. C., Harrat, Z., Belkaid, M., Raoult, D.** (2006). First molecular detection of *R. conorii*, *R.*

- aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Century of Rickettsiology: Emerging, Reemerging Rickettsioses, Molecular Diagnostics, and Emerging Veterinary Rickettsioses*, 1078, 368-372.
- Blažarová, L., Stanko, M., Carpi, G., Miklisova, D., Vichova, B., Mosansky, L., Bona, M., Derdákova, M.** (2014). Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(6), 928-938.
- Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gföller, M., Kanzler, M., Stanek, G., Walochnik, J.** (2008). *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*; 74(15), 4841-6.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**
- NCBI - NIH.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
Último acceso: 23/12/2018.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W.** (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, S247-69.
- Bogovic, P., Strle, F.** (2015). Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World journal of clinical cases*, 3(5), 430-441.
- Boldis, V., Spitalská, E.** (2010). *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks versus L929 and Vero cell lines in *Rickettsia slovaca* life cycle evaluated by quantitative real time PCR. *Experimental and Applied Acarology*, 50(4), 353-359.
- Bonet-Alavés, E., Guerrero-Espejo, A., Cuenca-Torres, M., Gimeno-Vilarrasa, F.** (2016). Incidence of Lyme disease in Spain. *Medicina Clínica*, 147(2), 88-9.
- Bonnet, S., Jouglin, M. L., Hostis, M., Chauvin, A.** (2007). *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, 13.
- Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicolle, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., Maingourd, C., Alongi, A., Torina, A., Fernández de Mera, I. G., Vicente, J., George, J. C., Vayssier-Taussat, M., Joncour, G.** (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13(4), 226-236.
- Boretti, F. S., Perreten, A., Meli, M. L., Cattori, V., Willi, B., Wengi, N., Hornok, S., Honegger, H., Hegglin, D., Woelfel, R., Reusch, C. E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R.** (2009). Molecular investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3230-3237.
- Bowman, D.** (2011). *Georgis Parasitología para veterinarios*. Ed. Elsevier.
- Bown, K. J., Lambin, X., Telford, G. R., Ogden, N. H., Telfer, S., Woldehiwet, Z., Birtles, R. J.** (2008). Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7118-7125.
- Bown, K. J., Lambin, X., Ogden, N. H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., Birtles, R. J.** (2009). Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1948-1954.

- Breuner, N. E., Hojgaard, A., Replogle, A. J., Boegler, K. A., Eisen, L. (2018). Transmission of the relapsing fever spirochete, *Borrelia miyamotoi*, by single transovarially-infected larval *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 9(6), 1464-1467.
- Brouqui, P., Rolain, J. M., Foucault, C., Raoult, D. (2005). Short report: Q fever and *Plasmodium falciparum* malaria co-infection in a patient returning from the Comoros archipelago. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(6), 1028-1030.
- Burkot, T. R., Happ, C. M., Dolan, M. C., Maupin, G. O. (2001). Infection of *Ixodes scapularis* (Acari : Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 167-171.
- Camacho, A. T., Pallas, E., Gestal, J. J., Guitián, F. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K., Telford, S. R. (2001). Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Veterinary Record*, 149(18), 552-555.
- Cao, W.-C., Zhan, L., He, J., Foley, J. E., De Vlas, S. J., Wu, X.-M., Yang, H., Richardus, J. H., Habbema, J. D. (2006). Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 664-668.
- Capelli, G., Ravagnan, S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Cazzin, S., Porcellato, E., Babiker, A. M., Cassini, R., Salvato, A., Cattoli, G., Otranto, D. (2012). Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasites and Vectors*, 5.
- Capligina, V., Berzina, I., Bormane, A., Salmane, I., Vilks, K., Kazarina, A., Bandere, D., Baumanis, V., Ranka, R. (2016). Prevalence and phylogenetic analysis of *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Latvia. *Experimental and Applied Acarology*, 68(3), 325-336.
- Carballeira, A., Devesa, C., Retuerto, R., Santillan, E., Uceda, F. (1983). Bioclimatología de Galicia. Ed: Fundacion pedro barrie de la maza, La Coruña, (España).
- Carlyon, J. A., Fikrig, E. (2003). Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, 5(11), 743-754.
- Carpi, G., Bertolotti, L., Pecchioli, E., Cagnacci, F., Rizzoli, A. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* groEL gene heterogeneity in *Ixodes ricinus* larvae feeding on roe deer in Northeastern Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 9(2), 179-184.
- Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: A review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1129-1141.
- Castro, L. R., Gabrielli, S., Iori, A., Cancrini, G. (2015). Molecular detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* sampled in northeastern, central, and insular areas of Italy. *Experimental and Applied Acarology*, 66(3), 443-452.
- Cathomas, F., Vorkommen, V. (2005). *Ixodes ricinus* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Städtischen Naherholungsgebieten am Beispiel von Basel (Schweiz)*, 8, 63-79.

- Cayol, C., Koskela, E., Mappes, T., Siukkola, A., Kallio, E. R. (2017). Temporal dynamics of the tick *Ixodes ricinus* in northern Europe: epidemiological implications. *Parasites Vectors*, 10.
- Chae, J. S., Yu, D. H., Shringi, S., Klein, T. A., Kim, H. C., Chong, S. T., Lee, I. Y., Foley, J. (2008). Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. *Journal of Veterinary Science*, 9(3), 285-293.
- Chastagner, A., Dugat, T., Vourc'h, G., Verheyden, H., Legrand, L., Bachy, V., Chabanne, L., Joncour, G., Maillard, R., Boulouis, H. J., Haddad, N., Bailly, X., Leblond, A. (2014). Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Veterinary Research*, 9(45), 114.
- Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S., Walker, D. H. (1994). Identification of a granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human-disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 589-595.
- Chen, G., Severo, M. S., Sohail, M., Sakhon, O. S., Wikel, S. K., Kotsyfakis, M., Pedra, J. H. F. (2012). *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. *Parasites and Vectors*, 5.
- Chmielewski, T., Podsiadly, E., Karbowiak, G., Tylewska-Wierzbowska, S. (2009). *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 486-488.
- Chmielewski, T., Tylewska-Wierzbowska, S. (2011). Inhibition of fibroblast apoptosis by *Borrelia afzelii*, *Coxiella burnetii* and *Bartonella henselae*. *Polish Journal of Microbiology*, 60(3), 269-272.
- Chochlakis, D., Ioannou, I., Sandalakis, V., Dimitriou, T., Kassinis, N., Papadopoulos, B., Tselentis, Y. Psaroulaki, A. (2012). Spotted fever group Rickettsiae in ticks in Cyprus. *Microbial Ecology*, 63(2), 314-323.
- Choi, Y. J., Lee, S. H., Park, K. H., Koh, Y. S., Lee, K. H., Baik, H. S., Choi, M. S., Kim, I. S., Jang, W. J. (2005). Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 759-763.
- Christova, I., Schouls, L., van de Pol, I., Park, J., Panayotov, S., Lefterova, V., Kantardjiev, T., Dumler, J. S. (2001). High prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4172-4174.
- ChromasPro: Technelysium Pty Ltd. <https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/> Último acceso: 23/12/2018.
- Cinco, M., Luzzati, R., Mascioli, M., Floris, R., Brouqui, P. (2006). Serological evidence of *Rickettsia* infections in forestry rangers in north-eastern Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(5), 493-495.
- Clark, K. L. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ticks in northeast Florida. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 262-268.
- Cochez, C., Heyman, P., Heylen, D., Fonville, M., Hengeveld, P., Takken, W., Simons, L., Sprong H. (2015). The Presence of *Borrelia miyamotoi*, a relapsing fever spirochaete, in questing *Ixodes ricinus* in Belgium and in The Netherlands. *Zoonosis and public health*, 62(5), 331-333.

- Cohan, F. M.** (2001). Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*, 50(4), 513-524.
- Corson, M. S., Teel, P. D., Grant, W. E.** (2004). Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. *Ecological Modelling*, 180, 487-514.
- Couto, C. G., Lorentzen, L., Beall, M. J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, J. I., Couto, K. M., Nash, S., Slack, J., Kvitko, H., Westendorf, N., Marin, L., Iazbik, M. C., Vicario, F. C., Sanz, P., Ruano, R.** (2010). Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10(9), 885-8.
- Crowder, C. D., Carolan, H. E., Rounds, M. A., Honig, V., Mothes, B., Haag, H., Nolte, O., Luft, B. J., Grubhoffer, L., Ecker, D. J., Schutzer, S. E., Eshoo, M. W.** (2014). Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1678-1682.
- da Silveira, J. A. G., Rabelo, E. M. L., Ribeiro, M. F. B.** (2011). Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 177, 61-66.
- Dantas-Torres, F.** (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites Vectors*, 3.
- Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G., Otranto, D.** (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Experimental Applied Acarology*, 61(1), 119-27.
- Darvishi M. M., Youssefi, M. R., Changizi, E., Shayan, P., Lima, R. R., Rahimi, M. T.** (2014) Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 284-289.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Schettler, E.** (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *International Journal Medical Microbiology*, 296 Suppl 40:149-56.
- de Carvalho, I. L., Zeidner, N., Ullmann, A., Hojgaard, A., Amaro, F., Zé-Zé, L., Alves, M. J., de Sousa, R., Piesman, J., Nuncio, M. S.** (2010). Molecular characterization of a new isolate of *Borrelia lusitaniae* derived from *Apodemus sylvaticus* in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10(5), 531-4.
- de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., Gortázar, C.** (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 382-6.
- de Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D., Bacellar, F.** (2006). *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1103-1108.
- de Sousa, R., Santos-Silva, M., Santos, A. S., Barros, S. C., Torgal, J., Walker, D. H., Bacellar, F.** (2007). *Rickettsia conorii israeli* tick typhus strain isolated from *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3), 444-447.

- de Sousa, R., Lopes de Carvalho, I., Santos, A. S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., Menezes, D., Nuncio, M. S. (2012). Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3767-9.
- Derdakova, M., Halanova, M., Stanko, M., Stefancikova, A., Cislakova, L., Pet'ko, B. (2003). Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(2), 269-271.
- Díaz, P., Arnal, J. L., Remesar, S., Pérez-Creo, A., Venzal, J. M., Vázquez-López, M. E., Prieto, A., Fernández, G., López, C. M., Panadero, R., Benito, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2017). Molecular identification of *Borrelia* spirochetes in questing *Ixodes ricinus* from northwestern Spain. *Parasites and Vectors*, 10.
- Diuk-Wasser, M. A., Liu, Y., Steeves, T. K., Folsom-O'Keefe, C., Dardick, K. R., Lepore, T., Bent, S. J., Usmani-Brown, S., Telford, S., Fish, D., Krause, P. J. (2014). Monitoring human babesiosis emergence through vector surveillance, New England, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 225-231.
- Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F., Sievers, M. (2009). *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 15(1), 98-100.
- Dobler, G., Wölfel, R. (2009). Typhus and other rickettsioses. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106, 348-54.
- Drancourt, M., George, F., Brouqui, P., Sampil, J., Raoult, D. (1992). Diagnosis of Mediterranean spotted-fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody coated immunomagnetic beads. *Journal of Infectious Diseases*, 166(3), 660-663.
- Drancourt, M., Berger, P., Terrada, C., Bodaghi, B., Conrath, J., Raoult, D., LeHoang, P. (2008). High prevalence of fastidious bacteria in 1.520 cases of uveitis of unknown etiology. *Medicine*, 87(3), 167-176.
- Dsouli, N., Younsi-Kabachii, H., Postic, D., Nouira, S., Gern, L., Bouattour, A. (2006). Reservoir role of lizard *Psammodromus algirus* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Spirochaetaceae) in Tunisia. *Journal of Medical Entomology*, 43(4), 737-742.
- Dugat, T., Loux, V., Marthey, S., Moroldo, M., Lagree, A. C., Boulouis, H. J., Haddad, N., Maillard, R. (2014). Comparative genomics of first available bovine *Anaplasma phagocytophilum* genome obtained with targeted sequence capture. *BMC Genomics*, 15, 14.
- Dugat, T., Lagree, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J., Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5.
- Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T. (2005). Cervids as babesiae hosts, Slovenia. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1121-1123.
- Dusbabek, F. (1996). Nymphal sexual dimorphism in the sheep tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Folia Parasitologica*, 43(1), 75-79.

- Earth System Research Laboratory**, 2018. <https://www.esrl.noaa.gov/> Último acceso: 04/04/2018
- Edelhofer, R., Baumgartner, W., Brit Cattle Vet, A.** (1996). Seroepidemiological studies of bovine *Anaplasma marginale* and *Babesia divergens* in Austria, involving autochthonous infections. World Association for Buiatrics - XIX Congress, Vols 1-3: Vols 1-2: Proceedings; Vol 3: Poster Presentation, 472-476.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare.** (2010). Scientific Opinion on Geographic Distribution of tick-borne infections and their vectors in Europe and the other regions of the Mediterranean basin, *EFSA Journal*, 8(9), 1723.
- Egyed, L., Elo, P., Sreter-Lancz, Z., Szell, Z., Balogh, Z., Sreter, T.** (2012). Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(2), 90-94.
- Elfving, K., Olsen, B., Bergstrom, S., Waldenstrom, J., Lundkvist, A., Sjostedt, A., Mejlon, H., Nilsson, K.** (2010). Dissemination of Spotted Fever *Rickettsia* Agents in Europe by Migrating Birds. *Plos One*, 5(1).
- EpiNorth.** (2014). A co-operation project for communicable disease control in Northern Europe. EpiNorth: Lyme borreliosis.
- Eremeeva, M. E., Oliveira, A., Robinson, J. B., Ribakova, N., Tokarevich, N. K., Dasch, G. A.** (2006). Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vo-logda Province of Russia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 291-298.
- Eremeeva, M. E., Dasch, G. A.** (2015). Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. *Frontiers in public health*, 3, 55-55.
- Escudero-Nieto, R., Guerrero-Espejo, A.** (2005). Diseases produced by *Borrelia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(4), 232-240.
- Espí, A., del Cerro, A., Somoano, A., García, V., Prieto, J. M., Barandika, J. F., García-Pérez, A. L.** (2017). *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence and diversity in ticks and small mammals in a Lyme borreliosis endemic nature reserve in North-Western Spain. Incidence in surrounding human populations. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(9), 563-568.
- Estrada-Peña, A., Jongejan, F.** (1999). Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and applied acarology*, 23(9), 685-715.
- Estrada-Peña, A.** (2002). Understanding the relationships between landscape connectivity and abundance of *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 28(1), 239-248.
- Estrada-Peña, A.** (2003). The relationships between habitat topology, critical scales of connectivity and tick abundance *Ixodes ricinus* in a heterogeneous landscape in northern Spain. *Ecography*, 26(5), 661-671.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., Walker, A. R.** (2004). Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species. Universidad de Zaragoza, España.
- Estrada-Peña, A., Martínez, J. M., Acedo, C. S., Quilez, J., del Cacho, E.** (2004). Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its

southern distribution range (central Spain). *Medical and Veterinary Entomology*, 18(4), 387-397.

Estrada-Peña, A., Ortega, C., Sánchez, N., DeSimone, L., Sudre, B., Suk, J. E., Semenza, J. C. (2011). Correlation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the Western Palearctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3838-3845.

Estrada-Peña, A., Estrada-Sánchez, A., Estrada-Sánchez, D., de la Fuente, J. (2013). Assessing the effects of variables and background selection on the capture of the tick climate niche. *International Journal of Health Geographics*, 12.

Estrada-Peña, A., de la Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, 108, 104-128.

Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 34(1), 53-65.

Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., Petney, T. N. (2017). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland. ISBN: 978-3-319-63759-4.

Etti, S., Hails, R., Schafer, S. M., De Michelis, S., Sewell, H. S., Bormane, A., Donaghy, M., Kurtenbach, K. (2003). Habitat-specific diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, exemplified by data from Latvia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 3008-3010.

EUCALB (2014) European Union concerted action on Lyme borreliosis

Felsenstein, J. (1985). phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 125(1), 1-15.

Fernández de Mera, I. G., Ruíz-Fons, F., de la Fuente, G., Mangold, A.J., Gortázar, C., de la Fuente, J. (2013). Spotted Fever Group *Rickettsiae* in questing ticks, central Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 1163-1165.

Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R. (2003). *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 889-890.

Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Álamo-Sanz, R., Encinas-Grandes, A. (2006). Spotted fever group *Rickettsiae* in ticks feeding on humans in Northwestern Spain - Is *Rickettsia conorii* vanishing? *Century of Rickettsiology: Emerging, Reemerging Rickettsioses, Molecular Diagnostics, and Emerging Veterinary Rickettsioses*, 1078, 331-333.

Floris, R., Yurtman, A. N., Margoni, E. F., Mignozzi, K., Boemo, B., Altobelli, A., Cinco, M. (2008). Detection and identification of *Rickettsia* species in the Northeast of Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 777-782.

Földvári, G., Siroky, P., Szekeres, S., Majoros, G., Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites and Vectors*, 9.

Foppa, I. M., Krause, P. J., Spielman, A., Goethert, H., Gern, L., Brand, B., Telford, S.R. (2002). Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 722-726.

- Fournier, P. E., Gouriet, F., Brouqui, P., Lucht, F., Raoult, D.** (2005). Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 40(10), 1435-1444.
- Franke, J., Fritzsche, J., Tomaso, H., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A.** (2010). Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6829-6836.
- Franke, J., Hildebrandt, A., Dorn, W.** (2013) Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes- updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick Borne Diseases*. 4,11-25
- Gabrielli, S., Otasevic, S., Ignjatovic, A., Savic, S., Fraulo, M., Arsic-Arsenijevic, V., Momčilović, S., Cancrini, G.** (2015). Canine babesiosis in non investigated areas of Serbia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15(9), 535-538.
- García-Pérez, A. L., Barandika, J., Oporto, B., Povedano, I., Juste, R. A.** (2003). *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 429-32.
- García-Pérez, A. L., Oporto, B., Espí, A., del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., Barandika, J. F., Hurtado, A.** (2016). Anaplasmatidae in wild ungulates and carnivores in northern Spain. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7(2):264-9.
- García, J. C., Núñez, M. J., Castro, B., Fraile, F. J., López, A., Mella, M. C., Blanco, A., Sieira, C., Loureiro, E., Portillo, A., Oteo, J. A.** (2006). Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 545-7.
- García-Sanmartín, J., Barandika, J. F., Juste, R. A., García-Pérez, A. L., Hurtado, A.** (2008). Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(4), 318-325.
- Gargili, A., Palomar, A. M., Midilli, K., Portillo, A., Kar, S., Oteo, J. A.** (2012). *Rickettsia* species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12(11), 938-941.
- Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O., Jarvekul, L., Fomenko, N., Golovljova, I.** (2012). Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian Ticks. *Plos One*, 7(12).
- Gern, L., Estrada-Peña, A., Frandsen, F., Gray, J. S., Jaenson, T. G., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P. A.** (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriell*, 287(3),196-204.
- Gern, L., Humair, P. F.** (2002). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, p. 149-174. In J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, and G. Stanek (ed.), *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom.
- Gern, L., Sell, K.** (2009). Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from the skin of the european badger (*Meles meles*) in Switzerland. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 207-208.

- Guerrero-Espejo, A., Gimeno, F.** (2016). Incidencia de la enfermedad de Lyme en España. *Medicina Clínica*, 147(2), 87–90
- Giammanco, G. M., Vitale, G., Mansueto, S., Capra, G., Caleca, M. P., Ammatuna, P.** (2005). Presence of *Rickettsia conorii* subsp *israelensis*, the causative agent of Israeli spotted fever, in Sicily, Italy, ascertained in a retrospective study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6027–6031.
- Giangaspero, A., Marangi, M., Papini, R., Paoletti, B., Wijnveld, M., Jongejan, F.** (2015). *Theileria* sp. OT3 and other tick-borne pathogens in sheep and ticks in Italy: molecular characterization and phylogeny. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 6, 75–83.
- Gil, H., Barral, M., Escudero, R., Garcia-Perez, A. L., Anda, P.** (2005). Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of northern Spain where Lyme disease is endemic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1336–1345.
- GIMP** - GNU Image Manipulation Program. <https://www.gimp.org/>. Último acceso: 23/12/2018.
- Ginsberg, H. S., Ewing, C. P.** (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari, Ixodidae). *Experimental Applied Acarology*, 7(4), 313–322.
- Global Agriculture Monitoring**, 2018. <http://glad.umd.edu/projects/global-agriculture-monitoring-glam-project>. Último acceso: 04/04/2018
- Gordon, J. L., Sibley, L. D.** (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *Bmc Genomics*, 6.
- Gray, J. S.** (1985). Ticks- their economic importance and methods of control. *Outlook on Agriculture*, 14(3), 136–142.
- Gray, J. S.** (1998). The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental Applied Acarology*, 22(5), 249–258.
- Gray, J. S.** (2008). *Ixodes ricinus* seasonal activity: Implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 19–24.
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Weiss, L.** (2010). Zoonotic babesiosis Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 1(1), 3–10.
- Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Levin, M. L., Tsao, J. I.** (2016). Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Diseases*, 7(5), 992–1003.
- Greene, C. E.** (2012). Infectious diseases of the dog and cat, fourth edition. *ELSEVIER, Saunders*, Missouri.
- Grubhoffer, L., Golovchenko, M., Vancová, M., Zacharovová-Slavícková, K., Rudenko, N., Oliver, Jr. J. H.** (2005). Lyme borreliosis: insights into tick-/host-*Borrelia* relations. *Folia Parasitol (Praha)*, 52, 279–94.
- Guglielmon, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., Shao, R., F., Barker, S. C.** (2010). The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, (2528) 1–28.

- Gunders, A. E.** (1977). Piroplasmal sporozoites in argasid *Ornithodoros erraticus*-(LUCAS). *Experientia*, 33(7), 892-893.
- Güner, E. S., Watanabe, M., Hashimoto, N., Kadosaka, T., Kawamura, Y., Ezaki, T., Imai, Y., Kaneda, K., Masuzawa, T.** (2004). *Borrelia turcica* sp nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1649-1652.
- Guy, E. C., Farquhar, R. G.** (1991). *Borrelia-burgdorferi* in urban parks. *Lancet*, 338(8761), 253-253.
- Guy, E., Tasker, S., Joynson, D. H. M.** (1998). Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in UK ticks using polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection*, 121(3), 681-683.
- Hajdušek, O., Sima, R., Ayllon, N., Jalovecka, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopacek, P.** (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
- Halos, L., Bord, S., Cotte, V., Gasqui, P., Abrial, D., Barnouin, J., Vayssier-Taussat, M., Vourc'h, G.** (2010). Ecological Factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4413-4420.
- Halos, L., Lebert, I., Chao, I., Vourc'h, G., Ducrot, C., Abrial, D., Ravier, J. F., Guillotm J.** (2013). Questionnaire-based survey on distribution and clinical incidence of canine babesiosis in France. *BMC Veterinary Research*, 9.
- Hamšíková, Z., Coipan, C., Mahríková, L., Minichová, L., Sprong, H., Kazimírová, M.** (2017). *Borrelia miyamotoi* and co-infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia. *Microbial Ecology*, 73(4), 1000-1008.
- Hanincová, K., Schafer, S. M., Etti, S., Sewell, H. S., Taragelova, V., Ziak, D., Labuda, M., Kurtenbach, K.** (2003). Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*, 126, 11-20.
- Hansford, K. M., Pietzsch, M. E., Cull, B., Medlock, J. M.** (2014). Tickborne diseases. Importation of *R. sanguineus* into the UK via dogs. *Veterinary Record*, 175(15).
- Hansford, K. M., Fonville, M., Jahfari, S., Sprong, H., Medlock, J. M.** (2015). *Borrelia miyamotoi* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in England. *Epidemiology and Infection*, 143(5), 1079-1087.
- Harris, S., Thompson, G. B.** (1978). Populations of ticks *Ixodes* (Phlebotomus) *hexagonus* and *Ixodes* (Phlebotomus) *canisuga* infesting suburban foxes, *Vulpes vulpes*. *Journal of Zoology*, 186, 83-93.
- Heinze, D. M., Carmical, J. R., Aronson, J. F., Thangamani, S.** (2012). Early immunologic events at the tick-host interface. *Plos One*, 7(10).
- Henniger, T., Henniger, P., Grossmann, T., Distl, O., Ganter, M., von Loewenich, F. D.** (2013). Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 38-38.
- Herwaldt, B. L., Linden, J. V., Bosserman, E., Young, C., Olkowska, D., Wilson, M.** (2011). Transfusion-associated babesiosis in the United States: A Description of cases.

Annals of Internal Medicine, 155(8), 509-519.

Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P.P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N. J. (2003). Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases journal*, 9(8), 943-948.

Heylen, D., De Coninck, E., Jansen, F. Madder, M. (XX). Differential diagnosis of the common songbird ticks in Western Europe: *Ixodes frontalis*, *Ixodes arboricola* and *Ixodes ricinus*. No publicado.

Heylen, D., Tijssen, E., Fonville, M., Matthysen, E., Sprong, H. (2013). Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community. *Environmental Microbiology*, 15(2), 663-73.

Heylen, D., De Coninck, E., Jansen, F., Madder, M. (2014). Differential diagnosis of three common *Ixodes* spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(6), 693-700.

Heylen, D., Fonville, M., van Leeuwen, A. D., Stroo, A., Duisterwinkel, M., van Wieren, S., Diuk-Wasser, M., de Bruin, A., Sprong, H. (2017). Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasites Vectors*, 10.

Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S. R., Losson, B., Saegerman, C., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., Papa, A. (2010). A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(1), 33-50.

Hodžić, E., Fish, D., Maretzki, C. M., de Silva, A. M., Feng, S. L., Barthold, S. W. (1998). Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3574-3578.

Holden, K., Boothby, J. T., Anand, S., Massung, R. F. (2003). Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a coastal region of California. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), 534-539.

Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.

Hoogstraal, H. (1985). Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, 24, 135-238.

Hornok, S., de la Fuente, J., Horvath, G., de Mera, I. G. F., Wijnveld, M., Tanczos, B., Farkas, R., Jongejans, F. (2013). Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in Ixodid ticks of carnivores from south Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61(1), 42-50.

Hornok, S., Kotschán, J., Kovács, D., Kovács, R., Angyal, D., Görföl, T., Polacsek, Z., Kalmár, Z., Mihalca, A. D. (2014). Bat ticks revisited: *Ixodes ariadnae* sp. nov. and allopatric genotypes of *I. vespertilionis* in caves of Hungary. *Parasites Vectors*, 27(7), 202.

Hovius, J. W., de Wever, B., Sohne, M., Brouwer, M. C., Coumou, J., Wagemakers, A., Oei, A., Knol, H., Narasimhan, S., Hodiamont, C. J., Jahfari, S., Pals, S. T., Horlings, H. M., Fikrig, E., Sprong, H., van Oers, M. H. (2014). A case of meningoencephalitis by the

- relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*, 382, 658.
- Hubalek, Z., Halouzka, J.** (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology*, 13(8), 951-957.
- Huegli, D., Hu, C. M., Humair, P. F., Wilske, B., Gern, L.** (2002). *Apodemus species* mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4735-4737.
- Huhn, C., Winter, C., Wolfsperger, T., Wuppenhorst, N., Smrdel, K. S., Skuballa, J., Pfäffle, M., Petney, T., Silaghi, C., Dyachenko, V., Pantchev, N., Straubinger, R. K., Schaarschmidt-Kiener, D., Ganter, M., Aardema, M. L., von Loewenich, F. D.** (2014). Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *Plos One*, 9(4).
- Humair, P. F., Postic, D., Wallich, R., Gern, L.** (1998). An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentbl. Bakteriol.* 287, 521-538.
- Ibarra, V., Portillo, A., Palomar, A. M., Sanz, M. M., Metola, L., Blanco, J. R., Oteo J. A.** (2012). Septic shock in a patient infected with *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), E283-E285.
- Ismail, N., Bloch, K. C., McBride, J. W.** (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in laboratory medicine*, 30(1), 261-292.
- Iwakami, S., Ichikawa, Y., Inokuma, H.** (2014). Molecular survey of *Babesia gibsoni* using *Haemaphysalis longicornis* collected from dogs and cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(9), 1313-1316.
- Jado, I., Oteo, J. A., Aldamiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M. J., García-Amil, C., Rodríguez-Moreno, I., Anda, P.** (2007). *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1405-1407.
- James, M. C., Bowman, A. S., Forbes, K. J., Lewis, F., McLeod, J. E., Gilbert, L.** (2013). Environmental determinants of *Ixodes ricinus* ticks and the incidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis, in Scotland. *Parasitology*, 140(2), 237-246.
- Jansen, A., La Scola, B., Raoult, D., Lierz, M., Wichmann, O., Stark, K., Schneider T.** (2008). Antibodies against *Rickettsia* spp. in Hunters, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1961-1963.
- Johns, R., Ohnishi, J., Broadwater, A., Sonenshine, D. E., De Silva, A. M., Hynes, W. L.** (2001). Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(1), 99-107.
- Jongejan, F., Uilenberg, G.** (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 3-14.
- Jongejan, F., Ringenier, M., Putting, M., Berger, L., Burgers, S., Kortekaas, R., Lenssen, J., van Roessel, M., Wijnveld, M., Madder, M.** (2015). Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium. *Parasites Vectors*, 8.

- Joseph, J. T., Roy, S. S., Shams, N., Visintainer, P., Nadelman, R. B., Hosur, S., Nelson, J., Wormser, G. P.** (2011). Babesiosis in Lower Hudson Valley, New York, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 843-847.
- Jouda, F., Perret, J. L., Gern, L.** (2004). Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 4(1), 23-32.
- Jouglin, M., Perez, G., Butet, A., Malandrin, L., Bastian, S.** (2017). Low prevalence of zoonotic *Babesia* in small mammals and *Ixodes ricinus* in Brittany, France. *Veterinary Parasitology*, 238, 58-60.
- Junttila, T., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M., Viljanen, M. K.** (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1361-1365.
- Kahl, O., Knülle, W.** (1988). Water vapour uptake from subsaturated atmospheres by engorged immature ixodid ticks. *Experimental Applied Acarology*, 4(1), 73-83.
- Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., Lane, R. S.** (2002). "Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls," in *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, eds J.S. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (New York, NY: CABI Publishing), 29-46.
- Kampen, H., Rotzel, D. C., Kurtenbach, K., Maier, W. A., Seitz, H. M.** (2004). Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1576-1582.
- Kantsø, B., Svendsen, C. B., Jensen, P. M., Vennestrom, J., Kroghfelt, K. A.** (2010). Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 1(2), 101-103.
- Karlsson, M. E., Andersson, M. O.** (2016). *Babesia* species in questing *Ixodes ricinus*, Sweden. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7(1), 10-12.
- Katargina, O., Geller, J., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Jarvekulg, L., Vene, S., Lundkvist, Å., Golovljova, I.** (2011). Detection and characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* ticks in Estonia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 923-928.
- Katargina, O., Geller, J., Alekseev, A., Dubinina, H., Efremova, G., Mishaeva, N., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekulg, L., Vene, S., Lundkvist, A., Golovljova, I.** (2012). Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 40-46.
- Katargina, O., Geller, J., Ivanova, A., Varv, K., Tefanova, V., Vene, S., Lundkvist, Å., Golovljova, I.** (2015). Detection and identification of *Rickettsia* species in *Ixodes* tick populations from Estonia. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 6(6), 689-694.
- Kauffmann, M., Rehbein, S., Hamel, D., Lutz, W., Heddergott, M., Pfister, K., Silaghi, C.** (2017). *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*)

in Germany. *Molecular and Cellular Probes*, 31, 46-54.

Kiewra, D., Kryza, M., Szymanowski, M. (2014). Influence of selected meteorological variables on the questing activity of *Ixodes ricinus* ticks in Lower Silesia, SW Poland. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 138-145.

Kilpatrick, A. M., Dobson, A. D. M., Levi, T., Salkeld, D. J., Swei, A., Ginsberg, H. S., Kjemtrup, A., Padgett, K. A., Jensen, P. M., Fish, D., Ogden, N. H., Diuk-Wasser, M. A. (2017). Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 372(1722).

Kjelland, V., Ytrehus, B., Stuen, S., Skarpaas, T., Slettan, A. (2011). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks collected from moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in southern Norway. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 2(2), 99-103.

Kocan, K. M., de la Fuente, J., Coburn, L. A. (2015). Insights into the development of *Ixodes scapularis*: a resource for research on a medically important tick species. *Parasites Vectors*, 8.

Krause, P. J., Barbour, A. G. (2015). *Borrelia miyamotoi* response. *Annals of Internal Medicine*, 163(12), 964-964.

Krause, P. J., Fish, D., Narasimhan, S., Barbour, A. G. (2015). *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(7), 631-639.

Krause, P. J., McKay, K., Gadbaw, J., Christianson, D., Closter, L., Lepore, T., Telford, S., Sikand, V., Ryan, R., Persing,

D., Radolf, J. D., Spielman, A. (2003). Increasing health burden of human babesiosis in endemic sites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 431-436.

Kreuzpaintner, G., Tischendorf, F. W. (2001). Fever and rash after holidays in the Mediterranean basin - Mediterranean spotted fever (boutonneuse fever). *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 126(18), 523-526.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H. S., Etti, S., Schafer, S. M., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Haninčová, K., Labuda, M., Bormane, A., Donaghy, M. (2001). Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4926-4929.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., Kraiczy, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, 10(2), 74-79.

Kurtenbach, K., Hanincova, K., Tsao, J. I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N. H. (2006). Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 660-669.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., Christensen, R. H. B. (2017). "lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models." *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1-26.

Kybicova, K., Bastova, K., Maly, M. (2017). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum*

in questing ticks *Ixodes ricinus* from the Czech Republic. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 8(4), 483-487.

Laaksonen, M., Klemola, T., Feuth, E., Sormunen, J. J., Puisto, A., Mäkelä, S., Penttinen, R., Ruohomäki, K., Hänninen, J., Sääksjärvi, I. E., Vuorinen, I., Sprong, H., Hytönen, J., Vesterinen, E. J. (2018). Tick-borne pathogens in Finland: comparison of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* in sympatric and parapatric areas. *Parasit Vectors*. 24, 11(1), 556.

Lempereur, L., De Cat, A., Caron, Y., Madder, M., Claerebout, E., Saegerman, C., Losson, B. (2011). First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(2), 125-130.

Lempereur, L., Lebrun, M., Cuvelier, P., Sepult, G., Caron, Y., Saegerman, C., Shiels, B., Losson, B. (2012). Longitudinal field study on bovine *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* infections during a grazing season in Belgium. *Parasitology Research*, 110(4), 1525-1530.

Leonhard, S., Hirzmann, J., Gall, Y., Fingerle, V., Pfister, K. (XX). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks from Southeast Germany. No publicado.

Levin, M. L., Fish, D. (2000). Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. *Infection and immunity*, 68, 2183-2186.

Li, H., Zheng, Y. C., Ma, L., Jia, N., Jiang, B. G., Jiang, R. R., Huo, Q. B., Wang, Y. W., Liu, H. B., Chu, Y. L., Song, Y. D., Yao, N. N., Sun, T., Zeng, F. Y., Dumler, J.

S., Jiang, J. F., Cao, W. C. (2015). Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. *The lancet. Infectious diseases*. 15(6), 663-70.

Littman, M. P., Gerber, B., Goldstein, R. E., Labato, M. A., Lappin, M. R., Moore, G. E. (2018). ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(3), 887-903.

Livio M, Mobilia A, Abbate S, Saffioti G, Nicolosi L, Isaia S, Calabrese, C., Graceffa, C. (2007). [Ticks bite in foresters]. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, 29(3 Suppl), 811-2.

Liz, J. S., Sumner, J. W., Pfister, K., Brossard, M. (2002). PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 892-897

Lledo, L., González, R., Gegúndez, M. I., Beltrán, M., Saz, J. V. (2009). Epidemiological study of rickettsial infections in patients with hypertransaminemia in Madrid (Spain). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(10), 2526-2533.

Lommano, E., Bertaiola, L., Dupasquier, C., Gern, L. (2012). Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in western Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4606-4612.

Madeddu, G., Mancini, F., Caddeo, A., Ciervo, A., Babudieri, S., Maida, I., Fiori, M. L., Rezza, G., Mura, M. S. (2012). *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness,

Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 702-704.

Maioli, G., Pistone, D., Bonilauri, P., Pajoro, M., Barbieri, I., Mulatto, P., Vicari, N., Dottori, M. (2012). Ethiological agents of rickettsiosis and anaplasmosis in ticks collected in Emilia-Romagna region (Italy) during 2008 and 2009. *Experimental and Applied Acarology*, 57(2), 199-208.

Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau, N., Chauvin, A. (2010). Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): Isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *International Journal for Parasitology*, 40, 277-284.

Malmsten, J., Widen, D. G., Rydevik, G., Yon, L., Hutchings, M. R., Thulin, C. G., Söderquist, L., Aspan, A., Stuen, S., Dalin, A. M. (2014). Temporal and spatial variation in *Anaplasma phagocytophilum* infection in Swedish moose (*Alces alces*). *Epidemiology and Infection*, 142(6), 1205-1213.

Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L., Gray, J. (2012). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *Fems Microbiology Reviews*, 36(4), 837-861.

Mans, B. J., Pienaar, R., Latif, A. A. (2015). A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology-Parasites and Wildlife*, 4, 104-118.

Mantelli, B., Pecchioli, E., Hauffe, H. C., Rosa, R., Rizzoli, A. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma*

phagocytophilum in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 25(11), 737-739.

Maraspin, V., Ružić-Sabljčić, E., Strle, F. (2006). Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerging Infectious Diseases*, 2, 1177.

Marie, J. L., Davoust, B., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P. (2012). Molecular detection of rickettsial agents in ticks and fleas collected from a European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Marseilles, France. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 35(1), 77-79.

Márquez, F. J. (2008). Spotted fever group Rickettsia in ticks from southeastern Spain natural parks. *Experimental and Applied Acarology*, 45(3-4), 185-194.

Márquez, F. J., Millan, J. (2009). *Rickettsiae* in ticks from wild and domestic carnivores of Donana National Park (Spain) and surrounding area. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 224-226.

Masala, G., Chisu, V., Satta, G., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P. (2012). *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor marginatus* ticks in Sardinia, Italy. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(5-6), 392-394.

Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic *Ehrlichiae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1090-1095.

Matuschka, F. R., Heiler, M., Eiffert, H., Fischer, P., Lotter, H., Spielman, A. (1993). Diversionary role of hoofed game in the transmission of lyme-disease spirochetes.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48(5), 693-699.

May, K., Strube, C. (2014). Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitology Research*, 113(6), 2169-2175.

Mead, P. S. (2015). Epidemiology of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 187-+.

Mediannikov, O., Fenollar, F. (2014). Looking in ticks for human bacterial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 77, 142-148.

Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Pena, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G. T., Jens-Kjeld, J., Per, J. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, Kurt., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites and Vectors*, 6.

Medlock, J. M., Leach, S. A. (2015). Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infectious Diseases*, 15(6), 721-730.

MEGA software. <https://www.megasoftware.net/> Último acceso: 23/12/2018.

Mehlhorn, H., Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* (Laveran, 1901) as *Theileria equi* (Mehlhorn, Schein 1998). *Parasitology Research*, 84(6), 467-475.

Mehlhorn, H., Scheunemann, R. (2008). Infections danger in ticks increases in autumn. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*, 36(5), 381-381.

Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C., Raoult, D. (2014). Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection Genetics and Evolution*, 25, 122-137.

Merino, F. J., Serrano, J. L., Saz, J. V., Nebreda, T., Gegúndez, M., Beltrán, M. (2000). Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *European Journal of Epidemiology*, 16(2), 97-100.

Meteogalicia, 2018. <http://www.meteogalicia.gal/web/index.action>. Último acceso: 04/04/2018.

Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., van der Wal, F. J., Sprong, H., Boye Pihl, T. P., Klitgaard, K., Bødker, R., Fach, P., Moutailler, S. (2014). High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.

Milhano, N., de Carvalho, I. L., Alves, A. S., Arroubé, S., Soares, J., Rodríguez, P., Carolino, M., Nuncio, M. S., Piesman, J., de Sousa, R. (2010). Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 1(4), 172-177.

Miro, G., Checa, R., Paparini, A., Ortega, N., Gonzalez-Fraga, J. L., Gofton, A., Bartolomé, A., Montoya, A., Gálvez, R., Pablo Mayo, P., Irwin, P. (2015). *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct

and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasites and Vectors*, 8.

Monks, D., Fisher, M., Forbes, N.A. (2006). *Ixodes frontalis* and avian tick-related syndrome in the United Kingdom. *Journal of Small Animal Practice* 47, 451-455.

Morganti, G., Gavaudan, S., Canonico, C., Ravagnan, S., Olivieri, E., Diaferia, M., Marenzoni, M. L., Antognoni, M. T., Capelli, G., Silaghi, C. Veronesi, F. (2017). Molecular survey on *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks infesting dogs in Central Italy. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 17(11), 743-748.

Morrison, W. I. (2015). The aetiology, pathogenesis and control of theileriosis in domestic animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 34(2), 599-611.

Movila, A., Uspenskaia, I., Toderas, I., Melnic, V., Conovalov, J. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Coxiella burnetii* in ticks collected in different biocenoses in the Republic of Moldova. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 172-176.

Movila, A., Rolain, J. M., Podavalenko, A., Toderas, I., Tkachenco, L., Naglov, V., Raoult, D. (2009). Detection of spotted fever group rickettsiae and family Anaplasmataceae in *Ixodes ricinus* ticks from Republic of Moldova and Eastern Ukraine. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 32-33.

Movila, A., Deriabina, T., Morozov, A., Sitnicova, N., Toderas, I., Uspenskaia, I., Alekhnovici, A. (2012). Abundance of adult ticks (Acari: Ixodidae) in the Chernobyl

Nuclear Power Plant Exclusion Zone. *Journal of Parasitology*, 98(4), 883-884.

Mura, A., Masala, G., Tola, S., Satta, G., Fois, F., Piras, P., Rolain, J. M., Raoult, D., Parola, P. (2008). First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, '*Candidatus Rickettsia barbariae*', in ticks from Sardinia, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1028-1033.

Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A. (2004). Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *International Journal for Parasitology*, 34, 1059-1067.

Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., Silaghi, C. (2014). A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 386-391.

Nava, S., Venzal, J., González Acuña, D., Martins, A., Guglielmo, A. (2017). Ticks of the southern cone of America. Diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. Ed. Academic Press.

Nelson, C., Banks, S., Jeffries, C. L., Walker, T., Logan, J. G. (2015). Tick abundances in South London parks and the potential risk for Lyme borreliosis to the general public. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(4), 448-452.

Ngwamidiba, M., Blanc, G., Raoult, D., Fournier, P. E. (2006). ScaI, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in *Rickettsia* species. *Bmc Microbiology*, 6.

- Nogueras, M. M., Cardenosa, N., Sanfeliu, I., Muñoz, T., Font, B., Segura, F.** (2006). Short report: Serological evidence of infection with *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* among the human population of Catalonia, in the northeast of Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 123-126.
- Norris, D. E., Klompen, J. S. H., Keirans, J. E., Black, W. C.** (1996). Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology*, 33(1), 78-89.
- Nosek, J., Kozuch, O., Rajcani, J., Ciampor, F.** (1972). Localization of tick borne encephalitis virus in alveolar cells of salivary glands of *Dermacentor marginatus* and *Haemaphysalis inermis* ticks. *Acta Virologica*, 16(6), 493.
- Oechslin, C. P., Heutschi, D., Lenz, N., Tischhauser, W., Peter, O., Rais, O., Beuret, C. M., Leib, S. L., Bankoul, S., Ackermann-Gäumann, R.** (2017). Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks in urban and suburban areas of Switzerland. *Parasites and Vectors*, 10.
- Ogden, N. H., Kurtenbach, K., Nuttall, P. A.** (1998). Interstadial and infestation level-dependent variation in the transmission efficiency of *Borrelia burgdorferi* from mice to *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental Applied Acarology*, 22(6), 367-372.
- Oines, O., Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Rosef, O.** (2012). Prevalence and diversity of *Babesia* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks from Norway. *Parasites and Vectors*, 5.
- Oliver, J. H. Jr.** (1989). Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20, 397-430.
- Orkun, Ö.** (2018). Molecular characterization based on 16S *rDNA* phylogeny of some Ixodid ticks in Turkey. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 42(2), 121-129.
- Ornstein, K., Berglund, J., Nilsson, I., Norrby, R., Bergstrom, S.** (2001). Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in southern Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1294-1298.
- Oteo, J. A., Blanco, J. R., Martínez de Artola, V., Ibarra, V.** (2000). First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerging Infectious Diseases*, 6(4), 430-2.
- Oteo, J. A., Ibarra, V., Blanco, J. R., Metola, L., Vallejo, M., de Artola, V. M.** (2003). Epidemiological and clinical differences among *Rickettsia slovaca* rickettsiosis and other tick-borne diseases in Spain. *Rickettsiology: Present and Future Directions*, 990, 355-356.
- Oteo, J. A., Portillo, A., Santibáñez, S., Blanco, J. R., Perez-Martínez, L., Ibarra, V.** (2006). Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2669-2671.
- Oteo, J. A., Portillo, A.** (2012). Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5-6), 270-277.
- Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Bock, G., Silaghi, C.** (2013). Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe

deer in southern Germany. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 4(4), 320-328.

Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, P., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Oteo, J. A. (2012). Genetic characterization of *Candidatus Rickettsia vini*, a new rickettsia amplified in ticks from La Rioja, Spain. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(5-6), 318-320.

Palomar, A. M., García-Álvarez, L., Santibáñez, S., Portillo, A., Oteo, J. A. (2014). Detection of tick-borne '*Candidatus Neorhlichia mikurensis*' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013. *Parasites and Vectors*, 7.

Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., García-Álvarez, L., Santibáñez, S., Gutiérrez, Ó., Oteo, J. A. (2015). Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 349-353.

Parola, P., Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. (vol 32, pg 897, 2001). *Clinical Infectious Diseases*, 33(5), 749-749.

Parola, P., Paddock, C. D., Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-+

Parola, P. (2006). Rickettsioses in sub-Saharan Africa. *Century of Rickettsiology: Emerging, Reemerging Rickettsioses, Molecular Diagnostics, and Emerging Veterinary Rickettsioses*, 1078, 42-47.

Parola, P., Socolovschi, C., Jeanjean, L., Bitam, I., Fournier, P.-E., Sotto, A., Labauge, P., Raoult, D. (2008). Warmer

Weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11), e338.7

Parola, P., Rovey, C., Rolain, J. M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D. (2009). *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. *Emerging Infectious Diseases*, 15(7), 1105-1108.

Parola, P. (2011). *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 996-1000.

Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 657-702.

Pato, F. J., Panadero, R., Vázquez, L., López, C. M., Díaz, P., Vázquez, E., Fernández, G. (2013). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(3), 660-665.

Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Rosef, O. (2012). Molecular detection and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 35(2), 187-195.

Pennisi, M. G., Hofmann-Lehmann, R., Radford, A. D., Tasker, S., Belák, S., Addie, D. D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K. (2017).

- Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(5), 542-548.
- Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M.L., Campino, L., Maia, C.** (2016). Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasites Vectors* 9.
- Pérez-Arellano, J. L., Fenollar, F., Angel-Moreno, A., Bolanos, M., Hernández, M., Santana, E., Hemmersbach-Miller, M., Martín, A. M., Raoult, D.** (2005). Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1961-1964.
- Pérez-Eid, C.** (2007). Les tiques. Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Ed. Coll. Monographies de microbiologie
- Pérez-Pérez, L., Portillo, A., Allegue, F., Zulaica, A., Oteo, J. A., Caeiro, J. L., Fabeiro, J.M.** (2010). *Dermacentor*-borne Necrosis Erythema and Lymphadenopathy (DEBONEL): A Case Associated with *Rickettsia rioja*. *Acta Dermatovenereologica*, 90(2), 214-215.
- Pérez-Sánchez, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes A.** (2005). Garrapatas y anaplasmosis granulocítica humana en Europa. Revisión de la situación en España. *Revista Ibérica de Parasitología*, 66 (1-4), 17-29.
- Pérez, D., Kneubuehler, Y., Rais, O., Gern, L.** (2012). Seasonality of *Ixodes ricinus* ticks on vegetation and on rodents and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies diversity in two Lyme Borreliosis-endemic areas in Switzerland. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12(8), 633-644.
- Perret, J. L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L.** (2000). Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitology Research*, 86(7), 554-557.
- Pet'ko, B., Stefanciková, A., Tresová, G., Peterková, J., Skardová, I., Prokopeáková, H., Cislaková, L.** (1996). Common tick (*Ixodes ricinus*) a source of infection in human and dogs as agent of Lyme borreliosis in Slovakia. *Slovenian Veterinary Research*, 21, 313-318.
- Petney, T. N., Pfaffle, M. P., Skuballa, J. D.** (2012). An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Systematic and Applied Acarology*, 17(2), 115-170.
- Petrovec, M., Furlan, S. L., Zupanc, T. A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J. S.** (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1556-1559.
- Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Childs, J. E., Avsic-Zupanc, T.** (2002). Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wiener klinische Wochenschrift*, 31, 114(13-14), 641-7.
- Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulasek, S., Elke, L., Wüst, G., Marth, E., Strasek, K., Stünzner, D. Avsic-Zupanc, T.** (2006). Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 103-6.

- Pichon, B., Rogers, M., Egan, D., Gray, J. (2005). Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 5(2), 172-180.
- Piesman, J., Spielman, A. (1980). Human babesiosis on Nantucket Island. Prevalence of *Babesia microti* in ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(5), 742-746.
- Pisanu, B., Chapuis, J. L., Dozieres, A., Basset, F., Poux, V., Vourc'h, G. (2014). High prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the European red squirrel *Sciurus vulgaris* in France. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(1), 1-6.
- Platonov, A. E., Karan, L. S., Kolyasnikova, N. M., Makhneva, N. A., Toporkova, M. G., Maleev, V. V., Fish, D., Krause, P. J. corresponding author. (2011). Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1816-1823.
- Popov, V. L., Han, V. C., Chen, S. M., Dumler, J. S., Feng, H. M., Andreadis, T. G., Tesh, R. B., Walker, D. H. (1998). Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), 235-251.
- Portillo, A., Santos, A. S., Santibáñez, S., Pérez-Martínez, L., Blanco, J. R., Ibarra, V., Oteo, J. A. (2005). Detection of a non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. *Rickettsioses: from Genome to Proteome, Pathobiology, and Rickettsiae as an International Threat*, 1063, 333-336.
- Portillo, A., Ibarra, V., Santibáñez, S., Pérez-Martínez, L., Blanco, J. R., Oteo, J. A. (2009). Genetic characterisation of *ompA*, *ompB* and *gltA* genes from *Candidatus Rickettsia rioja*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, Supplement 2, 307-308.
- Portillo, A., Pérez-Martínez, L., Santibáñez, S., Santibáñez, P., Palomar, A. M., Oteo, J. A. (2011). *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from the North of Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(1), 3-8.
- Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Palomar, A. M., Oteo, J. A. (2015). Rickettsioses in Europe. *Microbes and Infection*, 17(11-12), 834-838.
- Poupon, M. A., Lommano, E., Humair, P. F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L., Gern, L. (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 976-9.
- Quarsten, H., Skarpaas, T., Fajs, L., Noraas, S., Kjelland, V. (2015). Tick-borne bacteria in *Ixodes ricinus* collected in southern Norway evaluated by a commercial kit and established real-time PCR protocols. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 6(4), 538-544.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Real Academia Española (RAE): <https://dle.rae.es/?w=diccionario>. Último acceso: 23/12/2018.
- Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 87-99.
- Radulovic, Z., Chochlakis, D., Tomanovic, S., Milutinovic, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2011). First Detection of

Spotted Fever Group *Rickettsiae* in ticks in Serbia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(2), 111-115.

Randolph, S. E., Craine, N. G. (1995). General framework for comparative quantitative studies on transmission of tick-borne diseases using Lyme borreliosis in Europe as an example. *Journal of Medical Entomology*, 32(6), 765-77.

Randolph, S. E. (2000). Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. *Advances in Parasitology*, 47, 217-43.

Randolph, S. E., Green, R. M., Peacey, M. F., Rogers, D. J. (2000). Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121, 15-23.

Randolph, S. E., Green, R. M., Hoodless, A. N., Peacey, M. F. (2002). An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 979-989.

Randolph, S. E. (2004). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, 129, 37-S65.

Raoult, D., Weiller, P. J., Chagnon, A., Chaudet, H., Gallais, H., Casanova, P. (1986). Mediterranean spotted fever: clinical, laboratory and epidemiological features of 199 cases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(4), 845-850.

Rar, V., Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus* Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review.

Infection Genetics and Evolution, 11(8), 1842-1861.

Rauter, C., Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7203-7216.

Regnery, R. L., Spruill, C. L., Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of 2 rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173(5), 1576-1589.

Reis, C., Cote, M., Paul, R. E. L., Bonnet, S. (2011). Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 907-916.

Rene, M., Chene, J., Beauvils, J. P., Moro, C. V., Bourdoiseau, G., Mavingui, P., Chabanne, L. (2012). First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), 399-407.

Renvoise, A., van't Wout, J. W., van der Schroeffer, J. G., Beersma, M. F., Raoult, D. (2012). A case of rickettsialpox in Northern Europe. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(3), 221-222.

Reppert, E., Galindo, R. C., Breshears, M. A., Kocan, K. M., Blouin, E. F., de la Fuente, J. (2013). Demonstration of transplacental transmission of a human isolate of *Anaplasma phagocytophilum* in an experimentally infected sheep. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 93-96.

Requena-García, F., Cabrero-Sanudo, F., Olmeda-García, S., González, J.,

- Valcárcel, F.** (2017). Influence of environmental temperature and humidity on questing ticks in central Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 71(3), 277-290.
- Reye, A. L., Hubschen, J. M., Sausy, A., Muller, C. P.** (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2923-2931.
- Reye, A. L., Stegny, V., Mishaeva, N. P., Velhin, S., Hubschen, J. M., Ignatyev, G., Muller, C. P.** (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *Plos One*, 8(1).
- Richter, D., Matuschka, F. R.** (2006). Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4627-4632.
- Rikihisa, Y., Zhang, C. B., Christensen, B. M.** (2003). Molecular characterization of *Aegyptianella pullorum* (Rickettsiales, Anaplasmataceae). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5294-5297.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Špitalská, E., Kazimírová, M.** (2014). *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Frontiers in Public Health*, 2, 251-251.
- Rollend, L., Fish, D., Childs, J. E.** (2013). Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 4(1-2), 46-51.
- Ros-García, A., Hurtado, A.** (XX). First detection of *Babesia venatorum* infecting questing *Ixodes ricinus* in Spain. No publicado.
- Roux, V., Fournier, P. E., Raoult, D.** (1996). Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein *rOmpA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2058-2065.
- Rozej-Bielicka, W., Stypulkowska-Misiurewicz, H., Gołab, E.** (2015). Human babesiosis. *Przegląd epidemiologiczny*, 69, 489-94, 605-8.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O.** (2014). The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasites Vectors*, 7.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeffer, M., Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y. M., Leverenz, S., Dautel, H., Kahl, O.** (2016). Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Derrnacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7(1), 224-233.
- Rudolph, D., Knulle, W.** (1974). Site and mechanism of water-vapor uptake from atmosphere in Ixodid ticks. *Nature*, 249(5452), 84-85.
- Ruíz de Copegui-Fernández, R.** (2016). Manual práctico. Enfermedades infecciosas caninas. *Servet, Grupo Asís Biomédica*, Zaragoza.
- Ruíz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Gortázar, C., de la Fuente, J.** (2012). Factors driving the abundance of

- Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus* borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2669-2676.
- Ruyts, S. C., Frazer-Mendelewska, E., Van den Berge, K., Verheyen, K., Sprong, H. (2017). Molecular detection of tick-borne pathogens *Borrelia afzelii*, *Borrelia miyamotoi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *European Journal of Wildlife Research*, 63(3).
- Rymaszewska, A., Piotrowski, M. (2013). Use of DNA sequences for *Rickettsia* identification in *Ixodes ricinus* ticks: the first detection of *Rickettsia monacensis* in Poland. *Microbes and Infection*, 15(2), 140-146.
- Saah, A.J. (2002). Introducción a las rickettsiosis y las erliquisias. En: Mandell G. L., Bennett J. E., Dollin, R., eds. Mandell, Douglas y Bennett. *Enfermedades Infecciosas principios y práctica*. 5ªed. Madrid; Panamericana. 2469-71.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). On the maximum-likelihood method for molecular phylogeny. *Japanese Journal of Genetics*, 62(6), 547-548.
- Santibáñez, S., Portillo, A., Santibáñez, P., Palomar, A. M., Oteo, J. A. (2013). Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 283-288.
- Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Almeida, V. C., Bacellar, F., Dumler, J. S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643-1648.
- Sarkar, A., Hellberg, L., Bhattacharyya, A., Behnen, M., Wang, K. Q., Lord, J. M., Möller, S., Kohler, M., Solbach, W., Laskay, T. (2012). Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-kinase/akt and nf-kappa b survival pathways in neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*, 80(4), 1615-1623.
- Savic, S., Vidic, B., Grgic, Z., Potkonjak, A., Spasojevic, L. (2014). Emerging vector-borne diseases - incidence through vectors. *Frontiers in public health*, 2, 267-267.
- Savidge, C., Ewing, P., Andrews, J., Aucoin, D., Lappin, M. R., Moroff, S. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(2), 85-91.
- Sayama, Y., Zamoto-Niikura, A., Matsumoto, C., Saijo, M., Ishihara, C., Matsubayashi, K., Nagai, T. Satake, M. (2018). Analysis of antigen-antibody cross-reactivity among lineages and sublineages of *Babesia microti* parasites using human babesiosis specimens. *Transfusion*, 58(5), 1234-1244.
- Schmidt, K., Dressel, K. M., Niedrig, M., Mertens, M., Schuele, S. A., Groschup, M. H. (2013). Public health and vector-borne diseases - a new concept for risk governance. *Zoonoses and Public Health*, 60(8), 528-538.
- Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M., Silaghi, C. (2011). Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites Vectors*, 4.

- Schötta, A. M., Wijnveld, M., Stockinger, H., Stanek, G. (2017). Approaches for reverse line blot-based detection of microbial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria and impact of the chosen method. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13).
- Scoles, G. A., Papero, M., Beati, L., Fish, D. (2001). A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 1(1), 21.
- Sekeyova, Z., Mediannikov, O., Subramanian, G., Kowalczywska, M., Quevedo-Díaz, M., Kocianova, E., Raoult, D. (2012). Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. *Acta Virologica*, 56(3), 247-252.
- Selmi, M., Ballardini, M., Salvato, L., Ricci, E. (2017). *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks: analysis of the host-vector-pathogen interactions in a northern Mediterranean area. *Experimental and Applied Acarology*, 72(1), 79-91.
- Sen, E., Uchishima, Y., Okamoto, Y., Fukui, T., Kadosaka, T., Ohashi, N., Masuzawa, T. (2011). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 2(2), 94-98.
- Severinsson, K., Jaenson, T. G., Pettersson, J., Falk, K., Nilsson, K. (2010). Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasites and Vectors*, 3.
- Siebold, C. T. E., Stannius, H. F. (1845). Lehrbuch der vergleichenden. *Anatomieder Wirbeltiere*. Berlin, Veit publishers.
- Silaghi, C., Gilles, J., Hohle, M., Pradel, I., Just, F. T., Fingerle, V., Küchenhoff, H., Pfister, K. (2008). Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *Journal of Medical Entomology*, 45(5), 948-955.
- Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Pfeffer, M. (2011). Spotted fever group Rickettsiae in ticks, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 890-892.
- Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfister, K., Petney, T., Pfaeffle, M., Taraschewski, H., Passos, L. M. (2012). The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(1), 49-54.
- Simoes, P. B., Cardoso, L., Araujo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites Vectors*, 4.
- Simon, F., Savini, H., Parola, P. (2008). Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector Borne diseases. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1323-+.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Sixl, W., Petrovec, M., Marth, E., Wust, G., Stunzner, D., Schweiger, R., Avsic-Zupanc, T. (2003). Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in

Ixodes ricinus and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. *Rickettsiology: Present and Future Directions*, 990, 94-97.

Skarphedinsson, S., Lyholm, B. F., Ljungberg, M., Sogaard, P., Kolmos, H. J., Nielsen, L. P. (2007). Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *Apmis*, 115(3), 225-230.

Smrdel, K. S., Serdt, M., Duh, D., Knap, N., Zupanc, T. A. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia. *Parasites and Vectors*, 3.

Soares, J.F., Girotto, A., Brandao, P. E., Da Silva, A. S., Franca, R. T., Lopes, S. T. A., Labruna, M. B. (2011) Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180, 203-8.

Socolovschi, C., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P. (2009). Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 319-321.

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., Parola, P. (2009). The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Veterinary Research*, 40(2).

Socolovschi, C., Matsumoto, K., Phong, H. T., Davoust, B., Raoult, D., Parola, P. (2009). Transmission of *Rickettsia* sp. DmS1 in the tick, *Dermacentor marginatus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 322-323.

Socolovschi, C., Kernif, T., Raoult, D., Parola, P. (2012). *Borrelia*, *Rickettsia* and *Ehrlichia* Species in Bat Ticks, France, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 1966-1975.

Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37(2), 231-44.

Soleng, A., Kjelland, V. (2013). *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Bronnoysund in northern Norway. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 4(3), 218-221.

Sonenshine, D. E., Hamilton, J. G., Phillips, J. S., Lusby, W. R. (1991). Mounting sex-pheromone. It's role in regulation of mate recognition in the ixodidae. *Modern Acarology, Vols 1 and 2*, A69-A78.

Sonenshine, D. E. (1993). Biology of ticks. Oxford University Press.

Sormunen, J. J., Klemola, T., Vesterinen, E. J., Vuorinen, I., Hytonen, J., Hanninen, J., Ruohomäki, K., Sääksjärvi, I. E., Tonteri, E., Penttinen, R. (2016). Assessing the abundance, seasonal questing activity, and *Borrelia* and tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence of *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Southwest Finland. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7(1), 208-215.

Spitalska, E., Literak, I., Kocianova, E., Taragel'ova, V. (2011). The importance of *Ixodes arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Czech Republic, Central Europe. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(9), 1235-1241.

Spitalská, E., Boldis, V., Derdakova, M., Selyemova, D., Taragel'ova, V. R. (2014). *Rickettsial* infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(2), 161-165.

- Sprong, H., Wielinga, P. R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A. H., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J. W. (2009). *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites Vectors*, 2.
- Steere, A. C., Glickstein, L. (2004). Elucidation of Lyme arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 4(2), 143-152.
- Steere, A. C., Coburn, J., Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1093-1101.
- Stothard, D. R., Clark, J. B., Fuerst, P. A. (1994). Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from spotted-fever and typhus groups of rickettsia and antiquity of the genus *Rickettsia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 798-804.
- Strle, F. (2004). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 27-35.
- Stromdahl, E. Y., Williamson, P. C., Kollars, T. M., Evans, S. R., Barry, R. K., Vince, M. A., Dobbs, N. A. (2003). Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5557-5562.
- Stuen, S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, 31, 79-84.
- Stuen, S., Granquist, E. G., Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 31.
- Subramanian, G., Sekeyova, Z., Raoult, D., Mediannikov, O. (2012). Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(5-6), 405-409.
- Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J. F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M. N., Fish, D., Telford, S. R., Kantor, F. S., Fikrig, E. (2006). An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *Journal of Experimental Medicine*, 203(6), 1507-1517.
- Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Massung, R. F. (1997). PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 2087-2092.
- Svehlová, A., Berthova, L., Sallay, B., Boldis, V., Sparagano, O. A. E., Spitalska, E. (2014). Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia* species in Slovakia. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(5), 600-605.
- Sykes, E. (2014). Canine and feline infectious diseases. *Elsevier, Saunders, Missouri*.
- Szekeres, S., Coipan, E. C., Rigo, K., Majoros, G., Jahfari, S., Sprong, H., Foeldvari, G. (2015). Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Parasites Vectors*, 8.
- Takano, A., Toyomane, K., Konnai, S., Ohashi, K., Nakao, M., Ito, T., Andoh, M., Maeda, K., Watarai, M., Sato, K., Kawabata, H. (2014). Tick surveillance for

relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *Plos One*, 9(8).

Tälleklint, L., Jaenson, T. G. T. (1996). Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. *Journal of Medical Entomology*, 33(5), 805-811.

Tälleklint, L., Lane, R. S. (2000). Efficiency of drag sampling for estimating population sizes of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs in leaf litter. *Journal of Medical Entomology*, 37(3), 484-7.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M. (2008). Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 667-674.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 11030-11035.

Tappe, J., Jordan, D., Janecek, E., Fingerle, V., Strube, C. (2014). Revisited: *Borrelia burgdorferi* sensu lato infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany). *Parasites Vectors*, 7.

Taragel'ova, V., Koci, J., Hanincova, K., Oleksak, M. (2005). Songbirds as hosts for ticks (Acari, Ixodidae) in Slovakia. *Biologia*, 60(5), 529-537.

Tate, C. M., Howerth, E. W., Mead, D. G., Dugan, V. G., Luttrell, M. P., Sahora, A. I., Munderloh, U. G., Davidson, W. R., Yabsley, M. J. (2013). *Anaplasma odocoilei* sp nov (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).

Ticks and Tick Borne Diseases, 4(1-2), 110-119.

Thomas, R. J., Birtles, R. J., Radford, A. D., Woldehiwet, Z. (2012). Recurrent bacteraemia in sheep infected persistently with *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2-3), 360-367.

Tian, Z., Liu, G., Yin, H., Xie, J., Wang, S., Yuan, X., Wang, F., Luo, J. (2014). First report on the occurrence of *Theileria* sp. OT3 in China. *Parasitology International*, 63(2), 403-407.

Tijssen-Klasen, E., Jameson, L. J., Fonville, M., Leach, S., Sprong, H., Medlock, J. M. (2011). First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK. *Epidemiology and Infection*, 139(4), 524-529.

Tilly, K., Rosa, P., Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 217-34.

Toledo, A., Olmeda, A. S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M. A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P. (2009). Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 67-74.

Tomanovic, S., Chochlakis, D., Radulovic, Z., Milutinovic, M., Cakic, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2013). Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Experimental and Applied Acarology*, 59(3), 367-376.

Tomassone, L., Grego, E., Auricchio, D., Iori, A., Giannini, F., Rambozzi, L. (2013). Lyme borreliosis spirochetes and spotted

- fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa island, Tuscany Archipelago, Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13, 84–91.
- Townsend, R. L., Moritz, E. D., Fialkow, L. B., Berardi, V., Stramer, S. L. (2014). Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. *Transfusion*, 54(11), 2828-2832.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* - A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 3-10.
- van Duijvendijk, G., Coipan, C., Wagemakers, A., Fonville, M., Ersöz, J., Oei, A., Földvári, G., Hovius, J., Takken, W., Sprong H. (2016). Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasites and Vectors*, 20, 9, 97.
- Vannier, E., Krause, P. J. (2009) Update on babesiosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 984568.
- Vannier, E., Krause, P. J. (2012). Human Babesiosis. *New England Journal of Medicine*, 366(25), 2397-2407.
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., Hébert, C., Eloit, M. (2013). Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *Plos One*, 8(11).
- Vázquez-López, M., Pego-Reigosa, R., Díez-Morrondo, C., Castro-Gago, M., Díaz, P., Fernández, G., Morrondo, P. (2015). Epidemiology of Lyme disease in a healthcare area in north-west Spain. *Gaceta Sanitaria*, 29(3), 213-216.
- Vázquez-López, M. E., Pérez-Pacina, R., Díez-Morrondo, C., Díaz, P., Castro-Gago, M. (2016a) Enfermedad de Lyme en edad pediátrica. *Anales de Pediatría (Barc)*. 84, 234-235.
- Vázquez-López, M. E., Díez-Morrondo, C., Sánchez-Andrade, A., Pego-Reigosa, R., Díaz, P., Castro-Gago, M. (2016b). Manifestaciones articulares en enfermos de Lyme. *Reumatología Clínica*. 12(6), 327–330.
- Venclikova, K., Betasova, L., Sikutova, S., Jedlickova, P., Hubalek, Z., Rudolf, I. (2014). Human pathogenic borreliae in *Ixodes ricinus* ticks in natural and urban ecosystem (Czech Republic). *Acta Parasitologica*, 59(4), 717-720.
- Virasakdi, C. (2015). R Package “EpiDisplay”. <https://cran.r-project.org/web/packages/epiDisplay/index.html>.
- Wagemakers, A., Staarink, P. J., Sprong, H., Hovius, J. W. R. (2015). *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends in Parasitology*, 31(6), 260-269.
- Walker, A. R., Alberdi, M. P., Urquhart, K. A., Rose, H. (2001). Risk factors in habitats of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(1), 40-49.
- Walker, D. H., Valbuena, G. A., Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 1-11.
- Wallménius, K., Pettersson, J. H. O., Jaenson, T. G. T., Nilsson, K. (2012). Prevalence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Coxiella burnetii* in adult *Ixodes ricinus* ticks from 29 study

areas in central and southern Sweden. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 3(2), 100-106.

White, D. J., Talarico, J., Chang, H., Birkhead, G. S., Heimberger, T., Morse, D. L. (1998). Human babesiosis in new york state: Review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Archives of Internal Medicine*, 158(19), 2149-2154.

Wielinga, P. R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Akkerhuis, O., Jagers, G., Schouls, L. M., Borgsteede, F., van der Giessen, J. W. (2006). Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7594-7601.

Wilhelmsson, P., Lindblom, P., Fryland, L., Ernerudh, J., Forsberg, P., Lindgren, P. E. (2013). Prevalence, Diversity, and load of *Borrelia* species in ticks that have fed on humans in regions of Sweden and angstrom land Islands, Finland with different Lyme borreliosis incidences. *Plos One*, 8(11).

Wise, L. N., Pelzel-McCluskey, A. M., Mealey, R. H., Knowles, D. P. (2014). Equine piroplasmosis. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 30, 677-+.

Wodecka, B., Rymaszewska, A., Skotarczak, B. (2014). Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland. *Experimental and Applied Acarology*, 62(4), 543-555.

Wojcik-Fatla, A., Szymanska, J., Wdowiak, L., Buczek, A., Dutkiewicz, J. (2009). Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in

Ixodes ricinus ticks in the Lublin macroregion. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(1), 151-158.

Wojcik-Fatla, A., Zajac, V., Sawczyn, A., Cisak, E., Dutkiewicz, J. (2015). *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitology Research*, 114, 3111-3116.

Wojcik-Fatla, A., Zajac, V., Sawczyn, A., Sroka, J., Cisak, E., Dutkiewicz, J. (2016). Infections and mixed infections with the selected species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. *Experimental and Applied Acarology*, 68(2), 197-212.

Woldehiwet, Z. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in Ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 446-460.

Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 108-122.

Wuritu, G., Kawamori, F., Aochi, M., Masuda, T., Ohashi, N. (2009). Characterization of p44/msp2 multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different tick species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(2), 142-145.

Yabsley, M. J., Shock, B. C. (2012). Natural history of zoonotic *Babesia*: role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology, Parasites and Wildlife*, 22(2), 18-31.

Yang, J., Liu, Z., Niu, Q., Luo, J., Wang, X., Yin, H. (2016). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild cervids

and hares in China. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(2), 420-423

Ybañez, A. P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Inokuma, H. (2012). Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 232-236.

Yoshimoto, K., Matsuyama, Y., Matsuda, H., Sakamoto, L., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H. (2010). Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosa* in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology*, 168(1-2), 170-172.

Zahler, M., Gray, J., Pfister, K., Gothe, R., Rinder, H. (XX). Genetic heterogeneity of *Babesia microti* of different geographic origins. No publicado.

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84(7), 544-548.

Zahler, M., Rinder, H., Zweggarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E., Gothe, R. (2000). "*Babesia gibsoni*" of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology*, 120, 365-369.

Zajac, V., Wojcik-Fatla, A., Sawczyn, A., Cisak, E., Sroka, J., Kloc, A., Zajac, Z., Buczek, A., Dutkiewicz, J., Bartosik, K. (2017). Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(1), 26-32.

Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., de Mera, I. G. F., Gortazar, C., Carpignano, M. G., Ferroglia, E. (2014). Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites Vectors*, 7.

Zeman, P., Pecha, M. (2008). Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 203-210.

Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpaglia, M. L. P. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 301-8.

Zhang, L., Liu, Y., Ni, D., Li, Q., Yu, Y., Yu, X., Wan, K., Li, D., Liang, G., Jiang, X., Jing, H., Run, J., Luan, M., Fu, X., Zhang, J., Yang, W., Wang, Y., Dumler, J. S., Feng, Z., Ren, J., Xu, J. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 300(19), 2263-2270.

Žygutienė, M., Ranka, R., Salmina, K. (2003). Genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 13(4), 385-389.